

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Patologia Básica
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia



ISABELA TIEMY PEREIRA

**REGULAÇÃO DA ATIVAÇÃO EPIGENÉTICA DO GENE *MMP2* DIANTE DA
SINALIZAÇÃO DA FIBRONECTINA EM LINHAGENS TUMORAIS DE MAMA**

CURITIBA

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Patologia Básica
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia



ISABELA TIEMY PEREIRA

**REGULAÇÃO DA ATIVAÇÃO EPIGENÉTICA DO GENE *MMP2* DIANTE DA
SINALIZAÇÃO DA FIBRONECTINA EM LINHAGENS TUMORAIS DE MAMA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-graduação em
Microbiologia, Parasitologia e Patologia da
Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^a Dr^a Giseli Klassen

Co-orientadora: Dr^a Edneia A. S. R. Cavaliere

CURITIBA

2014

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Pereira, Isabela Tiemy

Regulação da ativação epigenética do gene MMP2 diante da sinalização da fibronectina em linhagens tumorais de mama. / Isabela Tiemy Pereira. – Curitiba, 2014.

72 f.: il. ; 30cm.

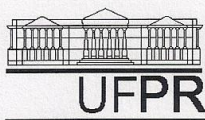
Orientadora: Giseli Klassen

Co-orientadora: Edneia Amancio de Souza Ramos Cavalieri

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

1. Mamas - Cancer. 2. Metilação de DNA. I. Título II. Klassen, Giseli. III. Cavalieri, Edneia Amancio de Souza Ramos. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

CDD (20. ed.) 574.2



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Patologia Básica
Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

TERMO DE APROVAÇÃO

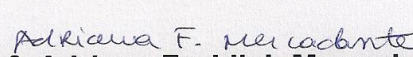
**“REGULAÇÃO DA ATIVAÇÃO EPIGENÉTICA DO GENE *MMP2*
DIANTE DA SINALIZAÇÃO DA FIBRONECTINA EM LINHAGENS
TUMORAIS DE MAMA”**

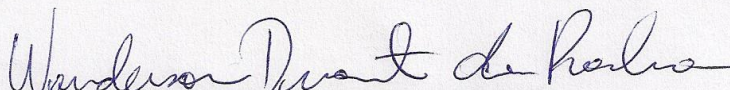
Por

ISABELA TIEMY PEREIRA

**Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre no Curso de Pós-Graduação em Microbiologia,
Parasitologia e Patologia, pela Comissão formada pelos
professores:**


Prof^ª. Dr^ª. Giseli Klassen (presidente)


Prof^ª. Dr^ª. Adriana Frohlich Mercadante


Prof. Dr. Wanderson Duarte da Rocha

Curitiba, 02 de dezembro de 2014.

*Dedico este trabalho aos meus pais, por
todo amor, apoio, confiança e incentivo
incondicionais. A motivação que me
impulsiona em direção às minhas (nossas)
vitórias vem de vocês. Obrigada por tudo,
pai e mãe.*

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof^a. Dra. Giseli Klassen, por todo o aprendizado no mundo da ciência, pela oportunidade de aguçar o gosto pela pesquisa, alimentando a curiosidade de uma jovem cientista. Agradeço pela orientação e amizade.

À minha co-orientadora, Dr^a Edneia A. S. R. Cavalieri, pelo acompanhamento, ensinamentos e suporte científico. Obrigada por me aceitar no seu projeto durante minha Iniciação Científica, pela orientação e amizade.

Às colegas e amigas do Laboratório de Epigenética: Andressa, Graciele, Liliane, Ana Carolina, Anna Caroline, Mariana, Giseli, Karin e Edneia, pelo convívio diário, entre risadas e discussões científicas. Aprendi e me diverti muito com vocês, amizade que levarei para a vida.

À minha família, pai, mãe e irmã, que sempre me apoiaram e me incentivaram a seguir meus objetivos. Por serem a minha base, meu suporte e por acreditarem em mim.

Ao Curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia da Universidade Federal do Paraná, pela oportunidade e formação.

Ao Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, pelo apoio à utilização de seus laboratórios e equipamentos, em especial ao Valter pela disposição e suporte técnico.

À CAPES e CNPq pela bolsa de Mestrado e pelo suporte financeiro.

RESUMO

O câncer de mama é o tipo de câncer mais frequente entre as mulheres em todo o mundo. A enzima MMP-2 é uma metaloprotease capaz de degradar o colágeno tipo IV, um dos principais constituintes da matriz extracelular (MEC). Sua função é amplamente descrita por atuar no mecanismo de metástases em diversos tipos de câncer. Estudos recentes demonstraram que a linhagem tumoral de mama MCF7 possui o gene *MMP2* regulado por metilação do DNA. Além disso, alguns estudos têm demonstrado que a fibronectina, uma importante proteína constituinte da MEC, é capaz de promover a expressão de MMP-2 em linhagens tumorais de mama. Resultados recentes do nosso grupo mostraram que a linhagem tumoral MCF7 quando tratada com fibronectina por 5 horas sofre 30% de desmetilação da região promotora do gene *MMP2*. Entretanto, observou-se também que tal processo foi transitório, porque houve a remetilação parcial do promotor quando o estímulo foi retirado. Ainda, a fibronectina induziu o aumento de uma marca de histona no promotor de *MMP2* que sinaliza para a ativação da transcrição gênica. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi dar continuidade a esse estudo, avaliando a regulação epigenética do gene *MMP2* em linhagens tumorais de mama após o cultivo com fibronectina em diferentes tempos. Para isso, células da linhagem MCF7 submetidas ao tratamento com fibronectina por 8, 12 e 24 horas, e da linhagem MDA-MB-436 por 24 horas, tiveram seus níveis de expressão de *MMP2*, metilação do DNA e modificações de histonas do promotor do gene avaliados. Na linhagem MCF7, o tratamento por 8, 12 e 24 horas foi capaz de promover o aumento da expressão de *MMP2* em 7, 25 e 9 vezes, respectivamente, comparado com o controle, assim como a redução da metilação do promotor de 90% (controle) para 70%, 40% e 52%, respectivamente. O tratamento por 24h também promoveu o aumento da marca de ativação gênica H3K4me3. Ainda, após 12h de cultivo com fibronectina, a linhagem MCF7 aumentou sua capacidade migratória. A fim de verificar se o efeito observado não era exclusivo da linhagem MCF7, foi incluída no estudo a linhagem MDA-MB-436 que foi submetida ao tratamento por 24h, e apresentou aumento na expressão gênica de *MMP2* (4 vezes) e redução da metilação do promotor (de 90% para 22%). Por fim, as células tratadas foram mantidas em cultivo sem a fibronectina para avaliar a estabilidade das modificações. Essas células, chamadas de recultivo, apresentaram uma redução na expressão gênica e aumento na metilação do promotor quando comparadas com as células logo após os tratamentos, confirmando o efeito transitório da fibronectina nos eventos epigenéticos, que já tinha sido observado após 5 horas de tratamento. Esses dados corroboram e complementam os mecanismos observados pelo nosso grupo de pesquisa e contribuem para a compreensão dos mecanismos epigenéticos que regulam a expressão de um importante gene associado às metástases tumorais.

Palavras-chave: Câncer de mama, MMP-2, epigenética, metilação do DNA.

ABSTRACT

Breast cancer is the most common cancer worldwide among women. The MMP-2 enzyme is a metalloprotease capable of degrading type IV collagen, a major constituent of the extracellular matrix (ECM). Its function is widely described by acting in the mechanism of metastasis in various cancers. Recent data has shown that the MCF7 breast tumor cell line has the *MMP2* gene regulated by DNA methylation. In addition, some studies have shown that fibronectin, an important constituent of the extracellular matrix, is capable of promoting MMP-2 expression in breast tumor cell lines. Recent results from our group showed that fibronectin was able to induce *MMP2* expression by a 30% decrease in its promoter methylation in MCF7 tumor cell line. However, it was also noted that this process was transient, because a partial promoter remethylation was observed when the stimulus was removed. Moreover, a histone marker for an open chromatin conformation was significantly increased. Therefore, the aim of this work was to continue evaluating the epigenetic regulation of the *MMP2* gene after cultivation of breast tumor cell lines with fibronectin at different times. To this reason, MCF7 cells subjected to treatment with fibronectin for 8, 12 and 24 hours and MDA-MB-436 cells subjected to treatment for 24 hours, were evaluated by the levels of *MMP2* expression, gene promoter DNA methylation and histone modifications. In the MCF7 cell line, treatments for 8, 12 and 24 hours were able to promote 7, 9 and 25-fold increase in *MMP2* expression, respectively, compared with the mock. In addition, promoter methylation was reduced from 90% (control) to 70%, 40% and 52%, respectively. Treatment for 24h also promoted an increase of the histone open chromatin conformation marker H3K4me3. Moreover, the migratory capacity of MCF7 cells treated for 12h was increased. In order to confirm the fibronectin effect, the MDA-MB-436 cell line was subjected to 24h fibronectin treatment, which showed an increase in *MMP2* gene expression (4-fold) and a reduction of promoter methylation (from 90% to 22%). Finally, the treated cells were kept in culture without fibronectin to evaluate the modifications stability. These cells (recultivation) showed a gene expression reduction and promoter methylation increased when compared to the cells after treatments, confirming the fibronectin transient effect observed after the 5h treatment. These data support and complement the mechanisms observed by our research group and contribute to understand the epigenetic mechanisms that regulate the expression of an important gene associated with tumor metastasis.

Keywords: Breast cancer, MMP-2, epigenetics, DNA methylation.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - MODULAÇÃO DO MICROAMBIENTE TUMORAL PELAS MMPs.....	15
FIGURA 2 - EXEMPLO DE MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA PELA INTERAÇÃO ENTRE AS MODIFICAÇÕES DE HISTONAS E A METILAÇÃO DO DNA.....	21
FIGURA 3 - LOCALIZAÇÃO DO GENE <i>MMP2</i>	41
FIGURA 4 - ILHAS DE CpG DO GENE <i>MMP2</i>	41
FIGURA 5 - ILHA DE CpG DO GENE <i>MMP2</i> AMPLIFICADA POR PCR...	42
FIGURA 6 - EXPRESSÃO DO GENE <i>MMP2</i> NA LINHAGEM MCF7.....	44
FIGURA 7 - EXPRESSÃO DO GENE <i>MMP2</i> NA LINHAGEM MDA-MB-436.....	45
FIGURA 8 - AMPLIFICAÇÃO E PURIFICAÇÃO DA ILHA DE CpG DO GENE <i>MMP2</i> NA LINHAGEM MCF7 SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTIVO.....	46
FIGURA 9 - AMPLIFICAÇÃO E PURIFICAÇÃO DA ILHA DE CpG DO GENE <i>MMP2</i> NA LINHAGEM MDA-MB-436 SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTIVO.....	46
FIGURA 10 - PERFIL DE METILAÇÃO DA ILHA DE CpG DO GENE <i>MMP2</i> DA LINHAGEM MCF7.....	47
FIGURA 11 - PERFIL DE METILAÇÃO DA ILHA DE CpG DO GENE <i>MMP2</i> DA LINHAGEM MDA-MB-436.....	48
FIGURA 12 - IMUNOPRECIPITAÇÃO DE CROMATINA DAS LINHAGENS MCF7 E MDA-MB-436.....	49
FIGURA 13 - IMUNOPRECIPITAÇÃO DE CROMATINA DAS LINHAGENS MCF7 E MDA-MB-436 TRATADAS COM FIBRONECTINA.....	50
FIGURA 14 - ENSAIO DE <i>WOUND HEALING</i> COM A LINHAGEM MCF7.....	51
FIGURA 15 - ENSAIO DE MIGRAÇÃO DA LINHAGEM MCF7 TRATADA COM FIBRONECTINA.....	51

LISTA DE SIGLAS

BRCA1 – gene *Breast cancer 1*

BRCA2 – gene *Breast cancer 2*

CGI – Ilha de CpG

ChIP – Imunoprecipitação de cromatina

CpG – Nucleotídeo Citosina seguido de Guanina

DAPI - 4',6-diamino-2-phenilindol

DNMTs - DNA metiltransferases

FN - Fibronectina

GAPDH – Gliceraldeído 3-phosfatase desidrogenase

HATs - Histonas acetiltransferases

HDACs - Histonas desacetilases

HMTs - Histonas metiltransferases

HPRT – Gene da hipoxantina guanina fosforibosil transferase

IARC - Agência Internacional para Pesquisa em Câncer

INCA – Instituto Nacional de Câncer

MEC – Matriz extracelular

miRNAs - microRNAs

MMP-14 – Metaloprotease 14

MMP-15 - Metaloprotease 15

MMP2 – Gene da Metaloprotease 2

MMP-2 – Metaloprotease 2

MMPs – Metaloproteases

MT1-MMP – Metaloprotease ancorada a membrana 1

MT2-MMP - Metaloprotease ancorada a membrana 2

ncRNAs - RNAs não codificadores

RE - Receptor de estrógeno

RP - Receptor de progesterona

SAM - 5-adenosilmetionina

SATR-1 – Proteína regulatória Esteroidogenica Agúda 1

TEM - Transição epitelial-mesenquimal

TET - Enzimas de translocação dez-onze (*ten-eleven-translocation*)

TIMP-2 – Inibidor Tecidual de Metaloprotease 2

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 O CÂNCER	12
1.2 O CÂNCER DE MAMA	12
1.2.1 Fatores de risco	13
1.2.2 Mecanismos moleculares do câncer	14
1.3 METALOPROTEINASES DE MATRIZ (MMPs)	16
1.3.1 MMP-2	17
1.4 EPIGENÉTICA	20
1.4.1 Metilação do DNA	21
1.4.2 Modificações de histonas	22
1.4.3 RNA não codificadores	20
2 JUSTIFICATIVA	24
CAPÍTULO I	26
CAPÍTULO II	37
3 OBJETIVOS	38
3.1 OBJETIVO GERAL	38
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38
4 METODOLOGIA	39
4.1 MATERIAL BIOLÓGICO	39
4.2 CULTIVO COM FIBRONECTINA E RECULTIVO	39
4.3 AVALIAÇÃO DO PADRÃO DE EXPRESSÃO DO GENE <i>MMP2</i> EM LINHAGENS DE MAMA	39
4.4 CLONAGEM E SEQUENCIAMENTO DA ILHA DE CpG DO GENE <i>MMP2</i>	40
4.4.1 Tratamento de DNA com bissulfito de sódio	40

4.4.2	Clonagem da ilha de CpG do gene <i>MMP2</i> de linhagens celulares de mama.....	40
4.5	IMUNOPRECIPITAÇÃO DE CROMATINA – ChIP	41
4.6	ENSAIOS DE POTENCIAL MIGRATÓRIO	41
4.6.1	Ensaio de <i>Wound healing</i>	41
4.6.2	Ensaio de Migração haptotática.....	42
5	RESULTADOS	43
5.1	ANÁLISE <i>IN SILICO</i> DO GENE <i>MMP2</i>	43
5.2	TRATAMENTO DAS LINHAGENS MCF7 E MDA-MB-436 COM FIBRONECTINA (FN)	44
5.3	EXPRESSÃO DE <i>MMP2</i> INDUZIDA POR FIBRONECTINA.....	45
5.4	CLONAGEM E SEQUENCIAMENTO DA ILHA DE CpG DO GENE <i>MMP2</i> APÓS O CULTIVO COM FIBRONECTINA.....	47
5.5	IMUNOPRECIPITAÇÃO DE CROMATINA – ChIP	51
5.6	AVALIAÇÃO DO POTENCIAL MIGRATÓRIO DA LINHAGEM TUMORAL MCF7.....	52
6	DISCUSSÃO	54
7	CONCLUSÃO	60
	REFERÊNCIAS	61
	ANEXOS	69

1 INTRODUÇÃO

1.1 O CÂNCER

O câncer é uma das principais causas de morte no mundo, responsável por 13% de todas as mortes (7,6 milhões) em 2008 (FERLAY *et al.*, 2010). Nos Estados Unidos, o câncer é a segunda maior causa de morte (23% do total), seguido das doenças cardíacas (SIEGEL *et al.*, 2014).

Estimativas mundiais do projeto Globocan 2012, da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC), apontaram em todo o mundo 14,1 milhões de casos novos de câncer e um total de 8,2 milhões de mortes por câncer em 2012. Em 2030, esperam-se 21,4 milhões de casos novos de câncer e 13,2 milhões de mortes por câncer em consequência do crescimento e do envelhecimento da população, bem como da redução na mortalidade infantil e nas mortes por doenças infecciosas em países em desenvolvimento (FERLAY *et al.*, 2013).

O câncer possui origem multifatorial e o crescente aumento no número de casos nas últimas décadas tem sido atribuído também aos estilos de vida que aumentam os números da doença, tais como o tabagismo, vida sedentária e hábitos alimentares inadequados, principalmente nos países ocidentais (JEMAL *et al.*, 2011).

No Brasil, a estimativa para o ano de 2014 (válida também para o ano de 2015) reforça a magnitude do problema do câncer no país. Estão previstos aproximadamente 576 mil casos novos de câncer, incluindo os casos de pele não melanoma. O mais incidente na população brasileira será o câncer de pele do tipo não melanoma, em seguida os tumores de próstata, mama feminina, cólon e reto, pulmão, estômago e colo do útero (INCA, 2014).

1.2 O CÂNCER DE MAMA

Entre as mulheres, o câncer de mama está no topo da lista entre os mais incidentes no mundo, representando 25% do total de diagnósticos. Aproximadamente 1,3 milhões de casos e 458.400 mortes ocorreram em 2008 (FERLAY *et al.*, 2010) e 1,67 milhões de casos e 522.000 mortes foram

estimadas para 2012 no mundo (FERLAY *et al.*, 2013). Nos Estados Unidos, é a principal causa de morte por câncer em mulheres entre 20 a 59 anos, e totalizou 40.678 mortes em 2009. Ainda, a estimativa é que o câncer de mama represente 29% do total de novos casos de câncer e 14% do total de mortes em 2014 (SIEGEL *et al.*, 2014). Além disso, é uma das principais causas de morte de mulheres nos países industrializados, principalmente de mulheres com idade entre 30 e 50 anos (ARTACHO-CORDÓN *et al.*, 2012). No Brasil, segundo dados do INCA, são estimados 57.120 novos casos de câncer de mama para 2014 (INCA, 2014).

O câncer de mama é um tumor maligno derivado de alterações genéticas e epigenéticas que levam à proliferação de células epiteliais para o interior de ductos ou lóbulos mamários (POLYAK, 2007). Os mais incidentes são o do tipo ductal, o qual corresponde a cerca de 80% dos tumores diagnosticados, e os lobulares, com aproximadamente 15% (SCHMITT & GOBBI, 2006; BOMBONATI & SGROI, 2011).

O carcinoma de mama *in situ* constitui um conjunto de lesões da mama caracterizado pela proliferação epitelial maligna restrita aos ductos ou lóbulos mamários e, portanto, totalmente limitadas pela lâmina basal (SCHMITT & GOBBI, 2006). O grupo dos carcinomas invasivos é caracterizado por uma profunda heterogeneidade histomorfológica e clínica (BOMBONATI & SGROI, 2010) e inclui todos os carcinomas mamários que infiltram o estroma, independentemente da coexistência de componente *in situ*. O carcinoma ductal invasivo é o tipo mais frequente de câncer de mama e apresenta comportamento agressivo (SCHMITT & GOBBI, 2006).

A resolução da heterogeneidade tumoral característica dos carcinomas invasivos é um grande desafio para o estudo e tratamento do câncer de mama (SORLIE, 2004). O câncer de mama é considerado uma doença heterogênea devido à diversidade de comportamento, tanto do ponto de vista clínico quanto biológico.

1.2.1 Fatores de risco

Fatores ambientais e estilo de vida têm relevante importância no desenvolvimento do câncer de mama, uma vez que a incidência e mortalidade

por essa neoplasia apresentam variação em relação à distribuição geográfica e à condição socioeconômica (TRICHOPOULOS *et al.*, 2008; FERLAY *et al.*, 2013). Sua ocorrência também é influenciada, dentre outros fatores, pelo gênero, idade, história reprodutiva da mulher, predisposição genética, doença benigna prévia, estilo de vida e exposição da mama à radiação (MCPHERSON *et al.*, 2000; TRICHOPOULOS *et al.*, 2008).

A incidência desse tipo de câncer aumenta com a idade, dobrando sua taxa a cada 10 anos até a menopausa, quando essa taxa reduz relativamente (MCPHERSON *et al.*, 2000). Com relação à história reprodutiva da mulher, a menarca precoce, menopausa tardia, nuliparidade, idade avançada de primeira gestação e uso de contraceptivos orais estão associados ao aumento do risco ao câncer. Adicionalmente, a predisposição genética pode elevar o risco ao câncer de mama, por exemplo, pelas mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2* que são responsáveis por uma proporção considerável dos tumores malignos de mama de caráter familiar (MCPHERSON *et al.*, 2000; TRICHOPOULOS *et al.*, 2008).

1.2.2 Mecanismos moleculares do câncer

A neoplasia consiste de uma comunidade de células tumorais heterogêneas e de células do estroma localizadas na matriz extracelular (MEC), nutridas por um sistema vascular (AZNAVOORIAN *et al.*, 1990).

A progressão do câncer é um processo complexo que pode ser dividido em etapas que envolvem diversas modificações, sendo que as principais estão no controle do ciclo celular (PARK & LEE, 2003). Hanahan e Weinberg *et al.*, 2011 sugeriram que seis alterações são fundamentais na progressão de um câncer, são elas: 1. Auto-suficiência de sinais de crescimento; 2. Insensibilidade aos sinais inibitórios de crescimento; 3. Evasão da morte celular programada (apoptose); 4. Potencial replicativo ilimitado; 5. Angiogênese sustentada; 6. Invasão tecidual e metástase. Na última década, outras marcas têm sido destacadas no desenvolvimento de tumores, como a instabilidade genômica, inflamação, reprogramação do metabolismo energético e evasão do sistema imune. Cada passo é crítico para o desenvolvimento de células hiperplásicas até

um tumor avançado que tem a capacidade de formar metástases para locais distantes (HANAHAHAN & WEINBERG, 2011).

Em algum momento durante o desenvolvimento da maioria dos tipos de câncer humanos, a massa do tumor primário pode gerar algumas células que passam a invadir tecidos adjacentes e depois adquirem a capacidade de migração para locais distantes, aonde podem se estabelecer para formar novas colônias, denominadas metástases (HANAHAHAN & WEINBERG, 2000).

A distribuição de células tumorais à distância, as metástases, é a causa de morte decorrente de tumores sólidos em 90% dos casos (ARTACHO-CORDÓN *et al.*, 2012; WEIGELT *et al.*, 2005). O processo metastático envolve as células tumorais, as células inflamatórias e do estroma. Inicialmente há uma transição epitelial-mesenquimal (TEM), processo no qual as células epiteliais perdem a polaridade apical-basal e os contatos célula-célula ganhando um fenótipo mesenquimal, o qual inclui o aumento do contato célula-MEC e migração celular (PARK & SCHWARZBAUER, 2013). Como parte do processo metastático, além do aumento da motilidade das células tumorais, é necessária a destruição da matriz extracelular próxima a essas células, abrindo um caminho para sua passagem (STAMENKOVIC, 2000).

Durante a progressão do câncer, a matriz extracelular passa por constante remodelamento, tanto pela degradação de moléculas pré-existentes, quanto pela síntese de novos componentes (KASPAR *et al.*, 2006) sendo o crescimento tumoral influenciado também pelo estroma, principalmente pelos fibroblastos, e não apenas pelas células malignas propriamente ditas (KALLURI & ZEISBERG, 2006). Além disso, a transformação da MEC é um regulador das interações estroma-células durante a formação de tumores malignos (GROBLEWSKA *et al.*, 2012).

A invasão e migração celular são processos complexos que envolvem a MEC, proteinases, quimiocinas, receptores de adesão e a membrana basal (BAUVOIS, 2012). A expressão de proteases produzidas pelo tumor e pelas células do estroma é normalmente associada a um pior prognóstico (KÖHRMANN *et al.*, 2009; LI *et al.*, 2004; MIN *et al.*, 2014; SHAH *et al.*, 2009), uma vez que elas são responsáveis pela degradação da MEC, possibilitando que células tumorais escapem do tumor primário e colonizem um novo ambiente (HANAHAHAN e WEINBERG, 2000; ARTACHO-CORDÓN *et al.*, 2012). Algumas

dessas proteases que representam componentes chaves na comunicação entre o tumor e o estroma são as metaloproteases de matriz (MMPs).

1.3 METALOPROTEASES DE MATRIZ (MMPs)

As metaloproteases de matriz são enzimas que constituem uma família de endopeptidases zinco-dependentes e participam de vários processos fisiológicos e de sinalização, atuando na clivagem de diversos substratos constituintes da MEC (STAMENKOVIC, 2000; KESSENBROCK *et al.*, 2011). Essa família é composta por 23 membros classificados de acordo com suas características estruturais e expressos em um estado enzimático inativo. A porção catalítica da enzima interage com o pró-domínio, que sofre clivagem e ativa a capacidade proteolítica da MMP (KESSENBROCK *et al.*, 2011). De acordo com a especificidade do substrato e a organização estrutural, as MMPs são classificadas em cinco sub-grupos: colagenases, gelatinases, estromelisinases, matrilisinas e as ancoradas à membrana (*membrane-type 1*) (SBARDELLA *et al.*, 2012).

Para evitar perturbações na arquitetura tecidual, a atividade das MMPs é estritamente regulada fisiologicamente e, em diversos tipos de câncer, inclusive no câncer de mama, esta atividade torna-se desregulada (ARTACHO-CORDÓN *et al.*, 2012). Estudos demonstram que essas enzimas são altamente expressas nos estágios iniciais de invasão tumoral e estão envolvidas nas etapas iniciais da carcinogênese mamária (STAMENKOVIC, 2000; ARTACHO-CORDÓN *et al.*, 2012).

Além da participação nos processos de invasão e metástase, as MMPs estão envolvidas na modulação de outros processos do microambiente tumoral, como nos sinais de crescimento celular, apoptose, processos angiogênicos e inflamatórios, além da preparação do nicho metastático, local onde as células metastáticas irão se estabelecer (Figura 1) (KESSENBROCK *et al.*, 2011; BAUVOIS, 2012).

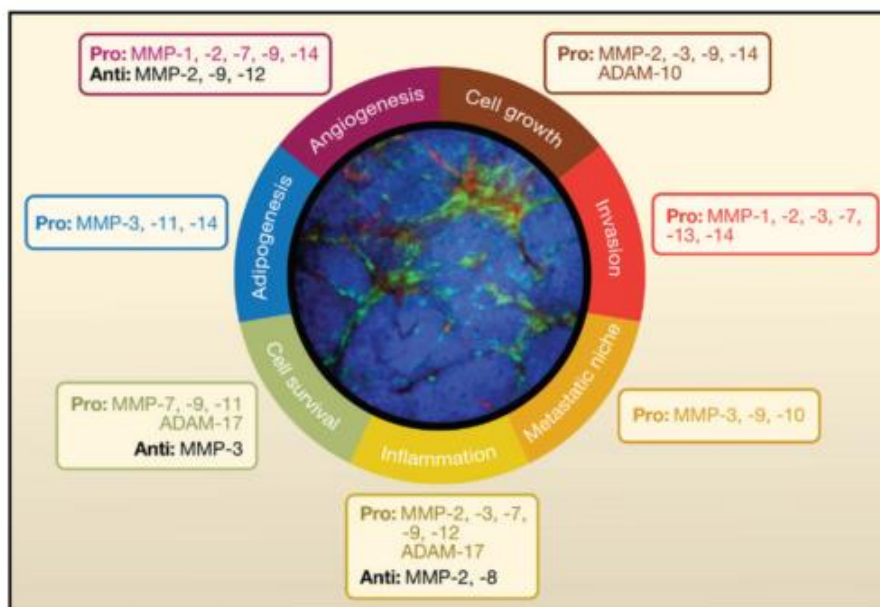


FIGURA 1 - MODULAÇÃO DO MICROAMBIENTE TUMORAL PELAS MMPs. Diversas MMPs participam dos processos envolvidos na carcinogênese: angiogênese (roxo), crescimento celular (marrom), invasão (vermelho), nicho metastático (laranja), inflamação (amarelo), sobrevivência celular (verde) e adipogênese (azul).

Fonte: KESSENBROCK *et al.*, 2011

1.3.1 MMP-2

A enzima MMP-2 ou gelatinase A pertence ao sub-grupo das gelatinases, as quais são caracterizadas pela presença do domínio de ligação ao colágeno (CBD - *collagen binding domain*), localizado na porção catalítica (SBARDELLA *et al.*, 2012). A MMP-2 é secretada na forma de zimogênio (proMMP-2), ou seja, para sua ativação é necessária a clivagem pós-traducional do seu pró-domínio na presença das moléculas TIMP-2 e MMP-14 (MT1-MMP) na superfície celular (BERNARDO & FRIDMAN, 2003; MOHAMMAD *et al.*, 2012; SBARDELLA *et al.*, 2012; ROBERTS *et al.*, 2002). Mecanismos alternativos de ativação biológica envolvendo a MMP-15 (MT2-MMP), trombina e uPAR também foram descritos (SBARDELLA *et al.*, 2012).

A enzima MMP-2 é capaz de clivar uma gama de substratos, entre citocinas, fatores de crescimento, receptores e fatores de ligação, além de componentes da MEC, como os colágenos do tipo I e IV (SBARDELLA *et al.*, 2012) e fibronectina (KENNY *et al.*, 2008). Essa metaloprotease é expressa constitutivamente em quase todos os tecidos humanos, principalmente por

fibroblastos, células endoteliais e epiteliais, estando envolvida em diversos processos biológicos e também patológicos, como neoplasias, doenças cardiovasculares e auto-imunes (SBARDELLA *et al.*, 2012).

Os tumores malignos possuem altos níveis de expressão de MMP-2 (BAUVOIS, 2012) e apresentam elevado risco de metástases, acarretando na diminuição do tempo de sobrevivência das pacientes (QUARANTA *et al.*, 2007; TALVENSAARI-MATTILA *et al.*, 2003). A metaloprotease MMP-2 atua na degradação final das fibras de colágeno, possibilitando a remodelagem da MEC e deste modo facilitando a migração células tumorais a partir do tecido circundante (ARTACHO-CORDÓN *et al.*, 2012).

Partyka e colaboradores (2012) demonstraram uma expressão elevada dessa enzima em tecidos de pacientes com câncer gástrico metastático confirmando sua participação nos processos neoplásicos e invasivos (PARTYKA *et al.*, 2012). A elevada expressão de MMP-2 no plasma de pacientes com câncer cólon retal linfonodos-positivos foi relacionada com a invasão linfática e, consequentemente, com o processo metastático nesta neoplasia (LANGENSKIÖLD *et al.*, 2005).

O nível de MMP-2 ativa tem sido considerado um indicador da disseminação de células tumorais por diversos autores (JEZIERSKA & MOTYL, 2009). Liu *et al.* (2006) demonstraram que a MMP-2 ativa e circulante no sangue pode ser um importante marcador solúvel relacionado com o tamanho do tumor mamário, indicando o risco de recorrência e auxiliando na definição da terapia (LIU *et al.*, 2006).

1.3.1.1 O microambiente tumoral e MMP-2

O microambiente tumoral é um importante contribuinte para a patogênese e progressão dos mais variados tipos de câncer. Tem um papel crítico como regulador na progressão de tumores por seu contato direto com as células tumorais, atuando como uma fonte importante de fatores de crescimento, motilidade e angiogênicos que podem afetar significativamente a biologia tumoral (BISSELL *et al.*, 1982; DAVIDSON *et al.*, 2014; GOUBRAN *et al.*, 2014). O estroma nos tumores é composto por macrófagos, fibroblastos e pela MEC que proporciona a base de coesão em torno das células tumorais (KASPAR *et al.*,

2006). Além disso, quando comparado com os tecidos normais, o estroma de tumores apresenta infiltrados celulares imunes, aumento de colágeno I e deposição de fibrina (RUDNICK e KUPERWASSER, 2012).

A MEC não é apenas um meio de suporte mecânico, mas também um modulador de sinais para as células (LELIÈVRE, 2009). Nesse contexto, sabe-se que a degradação da MEC pela MMP-2 é capaz de gerar ou liberar moléculas bioativas que influenciam na progressão tumoral. Tais moléculas fazem parte da rede de informação contida na MEC que pode desencadear, por exemplo, migração celular e angiogênese (BAUVOIS, 2012).

Diante disso, a relação entre as metaloproteases e as proteínas que compõem a MEC tem uma importância primordial na progressão de tumores. A MEC compõe o microambiente no qual as células estão inseridas, e é composta por uma rede de moléculas, tais como o colágeno, elastina, laminina, proteoglicanos hidrofílicos e fibronectina em baixas quantidades (LELIÈVRE, 2009). Por sua vez, a fibronectina desempenha muitas funções biológicas incluindo a integridade estrutural da MEC, a ligação entre as células, migração, controle da morfologia e diferenciação celular (STEFFENSEN *et al.*, 2002). Entretanto, essa proteína não está presente no tecido normal da mama, mas apresenta-se altamente expressa em tumores mamários (IOACHIM *et al.*, 2002) sendo inclusive associada à malignidade do tumor e ao prognóstico da doença (HELLEMAN *et al.*, 2008). A expressão da fibronectina está relacionada com a transição epitelial-mesenquimal (TEM) que constitui um dos eventos iniciais para as metástases (HELLEMAN *et al.*, 2008; PARK & SCHWARZBAUER, 2013).

Durante a TEM, alguns marcadores mesenquimais têm sua expressão aumentada, como a fibronectina, e também a MMP-2 que participa ativamente desse processo (PARK & SCHWARZBAUER, 2013). Feng e colaboradores (2007) avaliaram o perfil de expressão gênica em tumores primários de mama e em tumores metastáticos linfonodo-positivos e observaram que os genes que codificam as proteínas MMP-2 e fibronectina estavam mais expressos em tumores primários. Esse perfil é indicativo do envolvimento inicial dessas moléculas no processo metastático, no qual é necessária inicialmente a adesão das células tumorais à membrana basal – mediada por moléculas da MEC, tais como a fibronectina – e, então, a degradação dessa membrana – que ocorre por

meio de proteases, como a MMP-2 – para que aconteça a invasão de vasos sanguíneos e linfáticos (FENG *et al.*, 2007).

A regulação da expressão de diversos fatores envolvidos na progressão tumoral parece ser mediada por mecanismos epigenéticos, inclusive do gene *MMP2* e de outras MMPs. Diante disso, tais mecanismos serão descritos a seguir.

1.4 EPIGENÉTICA

A epigenética se refere a mudanças na expressão gênica que são atribuídas a alterações na cromatina que afetam a acessibilidade ao DNA, e que não envolvem mudanças na sequência de nucleotídeos. Essas alterações são reversíveis, herdáveis e resultam no aumento da expressão gênica ou no silenciamento gênico (BIRD, 2007; NOWSHEEN *et al.*, 2012; FEINBERG & TYCKO, 2004; MOMPALER, 2003).

As três principais alterações epigenéticas conhecidas são a metilação do DNA, as modificações pós-traducionais das histonas e os RNAs não codificadores (ncRNAs).

1.4.1 RNA não codificadores

Outro componente epigenético capaz de regular a expressão gênica são os RNAs não codificadores (ncRNAs). Dentre estes, o subgrupo dos microRNAs (miRNAs), que possuem cerca de 22 nucleotídeos de comprimento, tem sido associado ao desenvolvimento de diversas patologias, inclusive de tumores (CONNOLLY & STEARNS, 2012; DAWSON & KOUZARIDES, 2012; GARCÍA-GIMÉNEZ *et al.*, 2012). Estas moléculas reguladoras estão envolvidas com o silenciamento transcricional e pós-transcricional de genes, uma vez que se ligam a sequências alvo de mRNAs e os direcionam para clivagem ou simplesmente impedem sua tradução (BARTEL *et al.*, 2004; DAWSON & KOUZARIDES, 2012; CHERNOV & STRONGIN, 2011). O perfil de expressão de miRNAs é significativamente diferente entre as células normais e tumorais (CHERNOV & STRONGIN, 2011) e muitos já foram descritos como envolvidos na invasão e metástase no câncer de mama. Têm sido sugerido como fortes candidatos para

biomarcadores de diagnóstico e prognóstico nos próximos anos (CONNOLLY & STEARNS, 2012; GARCÍA-GIMÉNEZ *et al.*, 2012).

1.4.2 Metilação do DNA

A metilação do DNA é uma modificação química covalente resultante da metilação do carbono 5 de citosinas seguidas por guaninas na sequência gênica, os chamados dinucleotídeos CpG. Citosinas metiladas também foram documentadas no contexto CpA ou CpT (BIRD, 2002). A metilação ocorre quando um grupo metil oriundo da 5-adenosilmetionina (SAM – doador universal de metil) é adicionado à posição 5 do anel pirimídico da citosina (C), gerando a 5-metilcitosina (5mC), processo este catalisado pelas enzimas DNA metiltransferases (DNMTs) (BESTOR, 2000).

Sequências de DNA que possuem alta densidade dos dinucleotídeos CpG são denominadas 'Ilhas de CpG' e encontram-se geralmente associadas às regiões promotoras e reguladoras dos genes (ANTEQUERA, 2003; AUCLAIR & WEBER, 2012). A hipermetilação de ilhas de CpG em regiões promotoras é o evento mais comum de inativação epigenética de um gene (JONES & BAYLIN, 2002).

O padrão de metilação é mantido pela cooperação entre as DNMTs 1, 3a e 3b, uma vez que as sequências de DNA hemi-metiladas que aparecem imediatamente após a replicação ou reparação são preferencialmente metiladas (JELTSCH & JURKOWSKA, 2014). Entretanto, esses padrões encontram-se alterados em todos os tipos de câncer (AUCLAIR & WEBER, 2012), os quais apresentam geralmente uma perda de metilação global e adquirem uma hipermetilação em promotores específicos (GRONBAEK *et al.*, 2007).

O processo de desmetilação do DNA acontece naturalmente no genoma de mamíferos durante o desenvolvimento embrionário de duas maneiras distintas. O genoma materno é desmetilado através das divisões celulares por um processo passivo dependente da replicação, com redução da atividade da DNMT1. Por outro lado, o genoma paterno perde rapidamente a metilação de citosinas, de uma maneira ativa, antes mesmo da replicação do DNA (AUCLAIR & WEBER, 2012). Inúmeros estudos na última década têm buscado identificar as enzimas e mecanismos responsáveis por esse processo ativo de

desmetilação (SCHOMACHER, 2013), que também contribui para os padrões alterados de metilação observados no câncer (revisado por WILLIAMS *et al.*, 2012). Um dos mecanismos melhor compreendidos envolve a oxidação da 5-metilcitosina (5mC) à 5-hidroxi-metilcitosina (5hmC), e então à 5-formil-citosina (5fmC) e 5-carboxil-citosina (5caC) catalisadas por enzimas de translocação dez-onze, ou *ten-eleven-translocation* (TET). Ainda, a 5hmC pode sofrer deaminação gerando 5-hidroxi-metiluracil (5hmU). Por sua vez, esses intermediários (5hmC, 5fmC, 5caC e 5hmU) são removidos por glicosilases, seguido de reparo por excisão de bases que repõe a citosina não-metilada (AUCLAIR & WEBER, 2012; SCHOMACHER, 2013; WILLIAMS *et al.*, 2012; WU & ZHANG, 2011).

1.4.3 Modificações de histonas

A estrutura da cromatina exerce importante influência na regulação da expressão gênica. Proteínas associadas ao DNA, particularmente as histonas, têm um importante papel nessa estruturação. Um complexo octamérico formado por dímeros das histonas H2A, H2B, H3 e H4 possibilita o enrolamento do DNA e forma o chamado nucleossomo, unidade básica da cromatina (GEZER & HOLDENRIEDER, 2014). A região N-terminal das histonas é passível de sofrer uma variedade de modificações pós-traducionais em diversos resíduos de aminoácidos. Entre elas estão a acetilação, metilação, fosforilação, ubiquitinação, sumoilação, deaminação, entre outras (KOUZARIDES, 2007).

As modificações das histonas são catalisadas por enzimas específicas, dentre as quais as mais conhecidas são as histonas metiltransferases (HMTs), histonas acetiltransferases (HATs) e histonas desacetilases (HDACs) (GRONBAEK *et al.*, 2007; HABERLAND *et al.*, 2009).

Estas modificações estão envolvidas no estabelecimento do ambiente global da cromatina, que pode ser dividido em dois domínios: a eucromatina e a heterocromatina. A eucromatina, representa o material genético mantido acessível para a transcrição, onde os genes podem ser “ligados” ou “desligados”. O padrão de modificação das histonas determina este cenário, o qual possui altos níveis de acetilação e trimetilação nas lisinas 4, 36 e 79 da histona H3 (H3K4, H3K36 e H3K79). A heterocromatina representa o estado silenciado do

DNA, estando associado a baixos níveis de acetilação e altos níveis de metilação nas lisinas 9 e 27 da histona H3 (H3K9, H3K27) e na lisina 20 da histona H4 (H4K20) (KOUZARIDES, 2007; BERNSTEIN *et al.*, 2007).

A metilação do DNA e as modificações das histonas, apesar de serem catalisadas por grupos diferentes de enzimas, parecem estar relacionadas na participação da modulação do programa de expressão gênica das células (CEDAR & BERGMAN, 2009). As modificações de histonas podem se influenciar entre si e também interagir com a metilação do DNA através de complexos proteicos, determinando os estados de repressão e/ou ativação gênica, por exemplo (Figura 2).

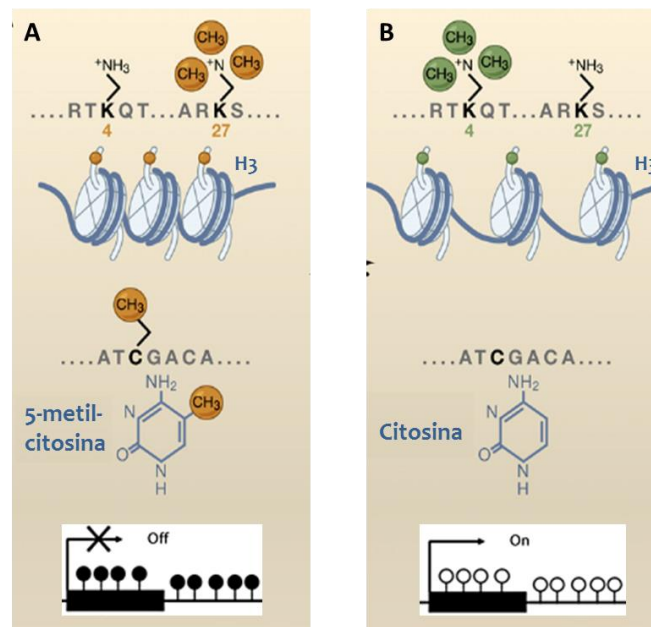


FIGURA 2 - EXEMPLO DE MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA PELA INTERAÇÃO ENTRE AS MODIFICAÇÕES DE HISTONAS E A METILAÇÃO DO DNA. (A) Repressão da expressão gênica: trimetilação da H3K27 e citosinas metiladas no DNA (5-metil-citosinas). (B) Expressão gênica ativa: trimetilação da H3K4 e citosinas não-metiladas no DNA. Adaptado de BERNSTEIN *et al.*, 2007.

2 JUSTIFICATIVA

A degradação da MEC é um acontecimento crítico e essencial para a migração de células tumorais durante a invasão de tecidos e metástases. Nesse contexto, as metaloproteases de matriz (MMPs) destacam-se uma vez que atuam na clivagem de diversos substratos constituintes da MEC (STAMENKOVIC, 2000) e a expressão dessas enzimas está associada a um pior prognóstico em diversos tipos de câncer (KÖHRMANN *et al.*, 2009; LI *et al.*, 2004; MIN *et al.*, 2014; SHAH *et al.*, 2009).

Em processos patológicos, como a progressão tumoral, o perfil de metilação do DNA apresenta-se perturbado (DAWSON & KOUZARIDES, 2012). Nowsheen e colaboradores (2012) afirmam que a avaliação de aspectos epigenéticos em tumores de mama poderá ajudar a elucidar a biologia e heterogeneidade dessa doença (NOWSHEEN *et al.*, 2012). Mais recentemente, ilhas de CpG têm sido descritas como elementos importantes na regulação do gene *MMP2*, bem como de outras MMPs. A hipometilação já foi descrita como ativadora de *MMP2* em câncer de próstata (SHUKEIR *et al.*, 2006) e tanto as alterações no perfil de metilação do DNA quanto as modificações das histonas na região promotora do gene *MMP2* já foram descritas na linhagem de câncer de mama MCF7 (CHERNOV *et al.*, 2009).

Além disso, trabalhos têm demonstrado a relação entre a fibronectina e a enzima MMP-2, onde a fibronectina associada às células da linhagem tumoral de mama MDA-MB-231 foi capaz de induzir a liberação da forma ativa de MMP-2 em fibroblastos normais (SAAD *et al.*, 2002). Sabe-se, ainda, que células da linhagem tumoral de mama MCF7 quando são expostas à fibronectina são capazes de secretar MMP-2 ativa (DAS *et al.*, 2008). A fibronectina também foi capaz de aumentar os seus próprios níveis de mRNA e os níveis da MMP-2 na linhagem de mama MCF10A (PARK & SCHWARZBAUER, 2013).

Diante disso, nosso grupo de pesquisa avaliou a relação da fibronectina com as modificações epigenéticas na expressão do gene *MMP2*. Resultados recentes apresentados na tese da doutora Edneia A. S. R. Cavalieri mostraram que a linhagem tumoral MCF7 quando tratada com fibronectina por 5 horas em meio isento de soro sofre 30% de desmetilação da região promotora do gene *MMP2*. Esse processo de desmetilação observado foi rápido e ativo, uma vez

que não foi dependente da replicação celular. Entretanto, observou-se também que tal processo foi transitório, uma vez que a retirada do estímulo proporcionou a remetilação parcial do promotor. Ainda, a fibronectina induziu o aumento significativo de uma marca de histona no promotor de *MMP2* que sinaliza para a ativação da transcrição gênica (RAMOS, 2013). Esses resultados provenientes da tese (RAMOS, 2013), em conjunto com os obtidos nesse estudo, demonstram à inter-relação da MEC e eventos epigenéticos de expressão gênica, e fizeram parte da publicação apresentada a seguir (PEREIRA *et al.*, 2014).

Além disso, o objetivo deste estudo contemplou também a continuidade do artigo publicado buscando compreender ainda mais a complexa regulação epigenética do gene *MMP2* frente à sinalização da fibronectina. Para isso, linhagens tumorais de mama foram submetidas ao tratamento com fibronectina por diferentes tempos (8, 12 e 24 horas) e tiveram novamente as alterações no padrão de metilação e modificações de histona no promotor do gene *MMP2* avaliadas.

CAPÍTULO I

Fibronectin affects transient *MMP2* gene expression through DNA demethylation changes in non-invasive breast cancer cell lines

ARTIGO PUBLICADO: Fibronectina afeta a expressão transiente do gene *MMP2* através de mudanças na desmetilação do DNA em linhagens tumorais de mama não invasivas.

Revista PloSOne. Setembro 2014, vol. 9 número 9. (e105806)

As metástases são responsáveis por mais de 90% das mortes por câncer. Células de tumores primários sólidos podem invadir tecidos adjacentes e migrar para órgãos distantes onde se estabelecem como novas colônias. O microambiente tumoral é reconhecido como um importante participante na sinalização que induz a migração celular. Um processo essencial para a metástase é a degradação da matriz extracelular (MEC) pelas metaloprotease de matriz (MMPs), que permitem as células tumorais invadirem tecidos e alcançarem os vasos sanguíneos. Os membros dessa família de proteínas inclui a gelatinase A ou MMP-2, a qual é responsável pela degradação do colágeno do tipo IV, o mais abundante componente da membrana basal, que separa as células epiteliais do estroma. É conhecido que a fibronectina é capaz de promover a expressão de MMP-2 em células da linhagem tumoral de mama MCF7 em cultura. Além disso, já é sabido que a expressão do gene *MMP2* é regulada por mecanismos epigenéticos. Neste trabalho, nós mostramos que a fibronectina foi capaz de induzir a expressão de *MMP2* através da desmetilação de 30% do promotor do gene. Ainda, uma marca de histona para abertura da cromatina foi aumentada. Esses resultados indicam um novo papel para a fibronectina na comunicação entre as células tumorais e a MEC, promovendo modificações epigenéticas.



Fibronectin Affects Transient *MMP2* Gene Expression through DNA Demethylation Changes in Non-Invasive Breast Cancer Cell Lines

Isabela T. Pereira^{1,3}, Edneia A. S. Ramos^{1,3}, Erico T. Costa², Anamaria A. Camargo², Graciele C. M. Manica¹, Liliane M. B. Klassen¹, Andressa Chequin¹, Karin Braun-Prado¹, Fábio de O. Pedrosa³, Emanuel M. Souza³, Fabricio F. Costa⁴, Giseli Klassen^{1*}

1 Department of Basic Pathology, Federal University of Parana, Curitiba, Paraná, Brazil, **2** Ludwig Institute for Cancer Research (LICR) at Molecular Oncology Center, Sirio-Libanês Hospital, São Paulo, São Paulo, Brazil, **3** Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Parana, Curitiba, Paraná, Brazil, **4** Cancer Biology and Epigenomics Program, Ann and Robert Lurie Children's Hospital of Chicago Research Center and Department of Pediatrics, Northwestern University's Feinberg School of Medicine, Chicago, Illinois, United States of America

Abstract

Metastasis accounts for more than 90% of cancer deaths. Cells from primary solid tumors may invade adjacent tissues and migrate to distant sites where they establish new colonies. The tumor microenvironment is now recognized as an important participant in the signaling that induces cancer cell migration. An essential process for metastasis is extracellular matrix (ECM) degradation by metalloproteases (MMPs), which allows tumor cells to invade local tissues and to reach blood vessels. The members of this protein family include gelatinase A, or MMP-2, which is responsible for the degradation of type IV collagen, the most abundant component of the basal membrane, that separates epithelial cells in the stroma. It is known that fibronectin is capable of promoting the expression of MMP-2 in MCF7 breast cancer cells in culture. In addition, it was already shown that the *MMP2* gene expression is regulated by epigenetic mechanisms. In this work, we showed that fibronectin was able to induce *MMP2* expression by 30% decrease in its promoter methylation. In addition, a histone marker for an open chromatin conformation was significantly increased. These results indicate a new role for fibronectin in the communication between cancer cells and the ECM, promoting epigenetic modifications.

Citation: Pereira IT, Ramos EAS, Costa ET, Camargo AA, Manica GCM, et al. (2014) Fibronectin Affects Transient *MMP2* Gene Expression through DNA Demethylation Changes in Non-Invasive Breast Cancer Cell Lines. PLoS ONE 9(9): e105806. doi:10.1371/journal.pone.0105806

Editor: Brian P. Chadwick, Florida State University, United States of America

Received: February 24, 2014; **Accepted:** July 25, 2014; **Published:** September 10, 2014

Copyright: © 2014 Pereira et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: Brazilian Research Council (CNPq) (process 479211/2012-4) and Coordination of Improvement of Higher Education Personnel (CAPES). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* Email: giseli@ufpr.br

† These authors contributed equally to this work.

Introduction

Breast cancer is the most prevalent cancer in women both in the developed and in the developing world. In the United States, it is estimated that breast cancer is the leading cause of all cancers (29%) and the second leading cause of death (14%) [1]. In Brazil, 57,120 new cases of breast cancer were estimated for 2014 [2].

From a clinical perspective, metastasis is considered one of the most important stages of tumor progression because it accounts for more than 90% of cancer deaths [3,4,5]. At some point during the development of most human cancers, cells from the primary tumor may invade adjacent tissues and migrate to distant sites, establishing new colonies called metastasis [5]. The tumor microenvironment is now recognized as an important participant in tumor progression, spreading and in treatment response. An essential process in the establishment of metastasis is the extracellular matrix degradation, which allows tumor cells to invade local tissues, leave the primary tumor and reach blood vessels [5]. This process is primarily influenced by the activity of proteases that are released at the site of the tumor, including the group of matrix metalloproteases (MMPs) [6].

Among the members of this family of proteins family, gelatinase A (MMP-2) is implicated in local tumor invasion and metastasis [7]. This process primarily occurs through the degradation of type IV collagen, the most abundant component of the basal membrane; this degradation is involved in the process of epithelial cells separation from the stroma [6,7].

It is known that in culture, fibronectin is capable of promoting the expression of MMP-2 in fibrosarcoma cells [8], cervical cancer cells [9], MCF7 breast cancer cells [10] and prostate cancer cells [11]. In addition, it has already been shown that *MMP2* gene expression is regulated by epigenetic mechanisms [12,13]. Therefore, the aim of this study was to evaluate the effects on the DNA methylation of the *MMP2* promoter after inducing *MMP2* expression with fibronectin. In order to achieve this goal, we used the well-characterized MCF7 and MDA-MB-436 breast cancer cell lines in our study to obtain more insights into the role of fibronectin in cancer metastasis.

Results

MMP2 gene activation by both 5-aza-2'-deoxycytidine and fibronectin in MCF7 cells

MCF7 breast tumor cells were submitted to four experiments: in serum free medium (SFM) without fibronectin (mock); treated with 5-aza-2'-deoxycytidine (5-Aza-treated) for seven days; in SFM containing fibronectin (FN) for five hours (FN-treated); and FN-treated cells were transferred to new culture dishes and maintained in SFM in culture for additional 48 hours without fibronectin (recultured cells). After these treatments, *MMP2* expression was assessed by qRT-PCR (Fig. 1). The MCF7 5-Aza-treated showed a 2.6-fold increase in *MMP2* expression compared to the mock. In contrast, 5 hours of the FN treatment induced in 5-fold the expression of *MMP2* (Fig. 1A). In addition, 48h after the FN withdrawal recultured cells showed decreased *MMP2* expression (2-fold compared to FN-treated) (Fig. 1A).

In order to confirm that these results were not restricted to the MCF7 tumor cell line, we analyzed the effects of FN treatment in *MMP2* expression in the breast cancer cell line MDA-MB-436. Accordingly, *MMP2* expression in FN-treated MDA-MB-436 cells was 1.6-fold significantly higher than mock (Fig. 1B).

MMP-2 enzymatic assay by zymography

Under these experimental treatments, *MMP-2* activity in MCF7 cells was measured by zymography assays. *MMP-2* enzyme isoforms of 72 kDa (pro-*MMP-2*) and 62 kDa (active *MMP-2*) were clearly observed after 5-Aza and FN treatments compared with conditioned SFM from mock cells that did not digest the gelatin substrate (Fig. S1). These results corroborate the gene expression data and indicate that *MMP-2* is secreted as an active proteinase after FN treatment in MCF7 cells (Fig. S1).

Fibronectin and changes in the global methylation profile of the *MMP2* gene promoter

To assess whether fibronectin has the potential to change the methylation profile in the promoter region of the *MMP2* gene, the DNA from MCF7 mock, 5-Aza-treated and FN-treated cells was extracted and subjected to sodium bisulfite conversion. The promoter region of *MMP2* was amplified, purified, cloned and sequenced (Fig. 2A) to evaluate epigenetic changes.

The sequence analysis showed that the *MMP2* gene promoter had 90%, 85% and 60% of global DNA methylation in MCF7 mock, 5-Aza-treated and FN-treated cells, respectively (Fig. 2A). In addition, to exclude cell lineage specificity, we analyzed the promoter *MMP2* sequence in the MDA-MB-436 mock and FN-treated cells. The similar demethylation effect was observed with 90% and 52% of global methylation in mock and FN-treated cells, respectively (Fig. S2).

To assess whether *MMP2* promoter demethylation would be maintained upon FN withdrawal, we performed a re-culture experiment in the absence of fibronectin. In this condition, MCF7 recultured cells showed 77% of methylation (Fig. 2A). The sequence data was represented in a graph and the CpG methylation status showed a clear difference between these three experimental conditions, particularly the CpGs 7–12 and 18–26 that were 40–50% demethylated in FN-treated and partially remethylated in MCF7 recultured cells (Fig. 2B).

Effects of fibronectin on the migration or invasion of MCF7 cells

Given the increased expression of *MMP2* after incubation with fibronectin (FN), the migratory potential of FN-treated cells was

tested by wound-healing and transwell migration assays. Microscopic examination at 60 h revealed a statistically significant increase in the wound-closure rate of FN-treated MCF7 cells compared with mock cells (Fig. 3). In contrast, using FN or collagen type-I as haptotactic factors in transwell assays, were not observed significant differences in the migratory rates between mock and FN-treated MCF7 cells (Fig. S3).

Complementary, the invasive ability of MCF7 cells was evaluated in a spheroid three-dimensional culture system (3D) after mock or FN treatments. 3D cultures of MCF7 cells showed that FN-treated cells did not acquire significant invasive potential despite of increased levels of active *MMP2* (Fig. S4). These results indicate that despite of increased secretion of active *MMP-2* (Fig. S2) and increased migratory ability observed in wound healing assays (Fig. 3), FN treatments were not sufficient to activate a fully invasive program in MCF7 cells under these experimental conditions.

Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) analysis

To assess histone modifications associated with the *MMP2* promoter gene, MCF7 mock, FN-treated and recultured cells were chromatin immunoprecipitated with antibodies associated with inactive chromatin (H3K27me3) [14] or with active chromatin (H3K4me3) [14]. The ChIP qPCR was performed for the *MMP2* promoter region as described [12]. The results of these experiments are shown (Fig. 2C).

The endogenous control H3 remained similar between the mock, FN-treated and recultured cells as expected. The transcription-silencing marker H3K27me3 remained similar in all conditions (Fig. 2C). In contrast, the H3K4me3 histone modification representing open chromatin was slightly but significantly increased in the *MMP2* promoter region after fibronectin treatment and recultured cells (Fig. 2C).

Discussion

The accumulation of genetic and epigenetic changes is commonly believed to promote cancer development. This concept provides the basis for our knowledge of cancer progression, but it cannot explain the heterogeneity in tumor cell growth, invasion and resistance to therapy. Approximately 90% of deaths from breast cancer are due to metastasis [3,4]. Metastasis is a complex and multistep process that requires the coordination of a number of properties by tumor cells. These properties include altered cell-cell and cell-substratum adhesion, increased motility, altered growth control, the ability to produce angiogenic factors, and increased expression of proteases [15]. Different groups of genes that can be activated or silenced in the metastatic process include the metalloproteases, especially the *MMP2* gene [6]. In addition to intrinsic factors of tumor cells, the extracellular matrix (ECM) is a key component of a cell's microenvironment that cooperates with extracellular molecules to relay signals into cells. The stromal ECM protein fibronectin is essentially absent from normal adult breast tissue [16] and increased fibronectin mRNA and protein levels have been detected in breast tumors stroma [17,18]. It is already known that fibronectin is capable of promoting the expression of *MMP-2* in breast tumor cell lines [10,19]. In contrast, it has been shown that this gene is regulated by epigenetic changes, including DNA methylation and histone modifications [12,13]. Similarly to an epigenetic repression, sequencing the *MMP2* promoter of MCF7 mock cells revealed 90% of methylation. 5-aza and FN-treated MCF7 cells showed a 2.6 and 5-fold increase, respectively, in *MMP2* gene expression compared to mock cells (Fig. 1A). In agreement, zymography

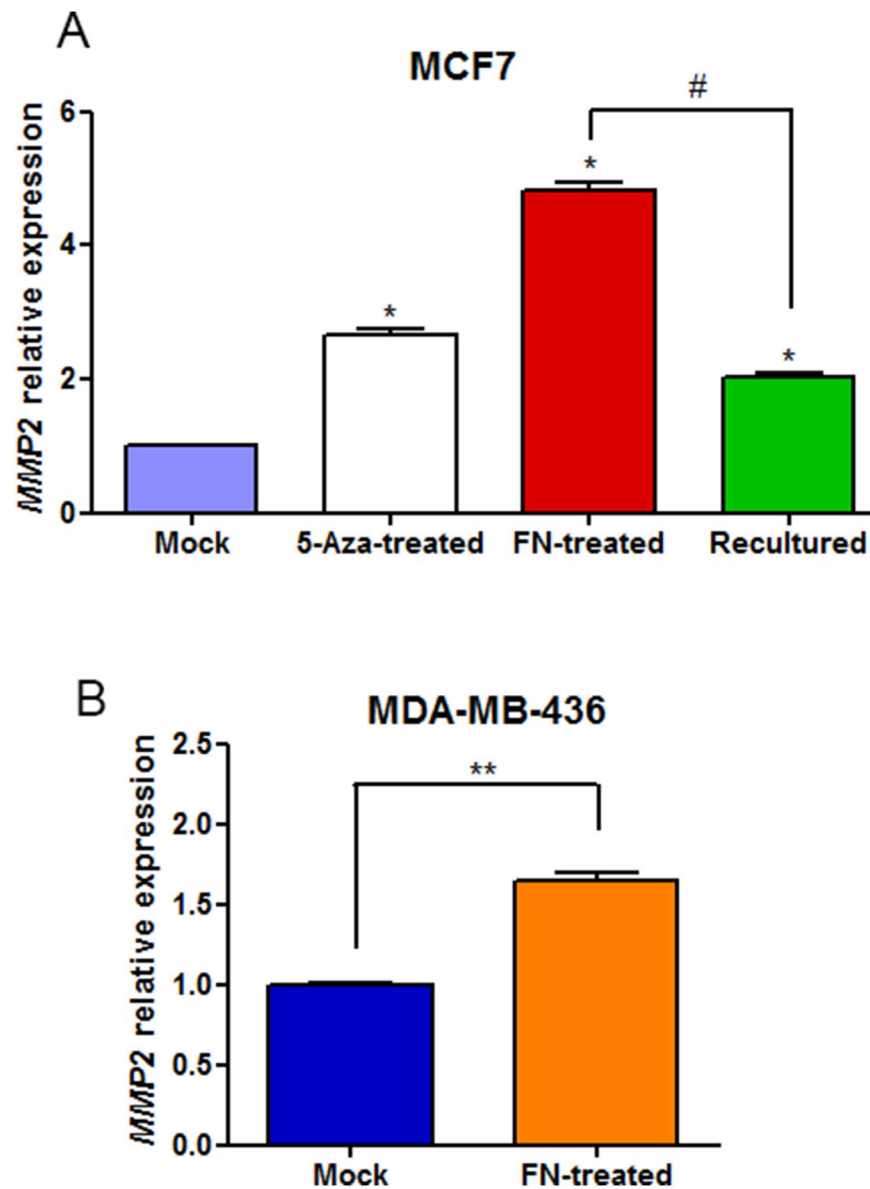


Figure 1. *MMP2* expression after treatment in breast cancer cell lines. A: The expression of *MMP2* after treatments in MCF7 cells was shown. Mock (blue); 5-Aza-treated (white), FN-treated (red) and recultured (green). Results were expressed as mean S.E.M. and statistical comparison was performed using *t* test analysis. * $p < 0.05$ when compared to mock; # $p < 0.05$ when FN-treated compared to recultured. B: The expression of *MMP2* in MDA-MB-436 cells, mock and after FN treatment were shown. Mock (blue) and FN-treated (orange) were expressed as mean S.E.M. and statistical comparison was performed using Student's *t* Test. ** $p < 0.05$ when compared to mock.
doi:10.1371/journal.pone.0105806.g001

assays showed that the *MMP-2* proteinase was active and secreted by MCF7 cells after inductive treatments (i.e. 5-Aza and FN, Figure S1). In 5-Aza-treated cells, despite the expression of the *MMP2* gene, a discrete demethylation in the promoter region was observed (Fig. 2A). Another study showed a similar result, and the authors noted that the inhibition of DNMT1 by 5-Aza treatment affected the expression of *MMP2* indirectly through methylation-independent mechanisms [13].

In contrast, FN-treated MCF7 cells showed a 5-fold increase in *MMP2* gene expression and 60% of global methylation (Fig. 2A). To exclude the possibility that these results are restricted to MCF7 tumor cells, we analyzed the *MMP2* promoter sequence in the MDA-MB-436 breast cancer cell line. The similar demethylation effect was observed with 90% and 52% of global methylation in

mock and FN-treated MDA-MB-436 cells, respectively (Fig. S2). This is the first time that DNA demethylation was observed in the *MMP2* gene induced by a protein from extracellular matrix (ECM). The ECM or the microenvironment in which the cells are embedded is composed of a network of fibrillar molecules, including collagen and elastin; glycoproteins, such as laminin and fibronectin; and proteoglycans [16]. The epithelial-mesenchymal transition (EMT) is a phenotypic conversion that occurs during embryonic development and tissue remodeling, and it is essential for the development of metastasis [20]. EMT is a dynamic and reversible process that can occur in cells located at the tumor periphery. This process is triggered by signals, such as TGF, TNF and Wnt [21,22], received from the microenvironment, and it has recently been proposed that fibronectin has an

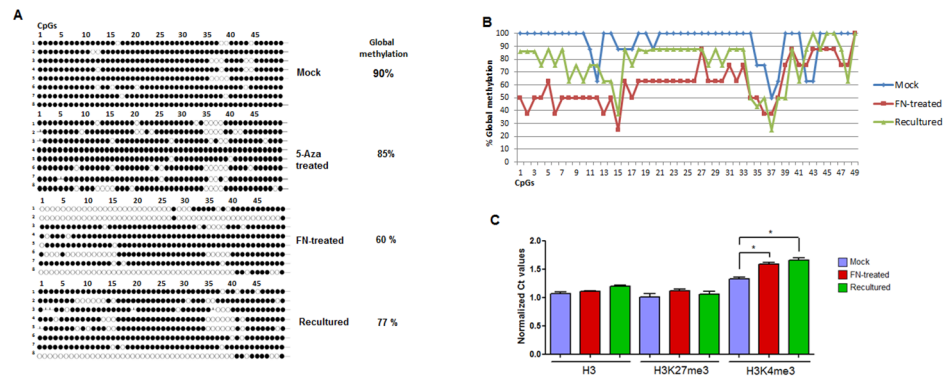


Figure 2. Epigenetic changes in the *MMP2* gene promoter in MCF7 cells. A: Sequencing of the *MMP2* gene promoter. Closed and open circles represent methylated or unmethylated CpGs, respectively. On the left the number represent the sequenced clones. The 49 analyzed CpGs in the *MMP2* promoter region are shown. Mock cells are at the top, above is 5-Aza-treated, hereafter FN-treated, recultured (MCF7 FN-treated and then cultured for 48 hours without fibronectin). The global methylation percentage is also shown at the right. B: Graphical analysis of CpG methylation pattern in the *MMP2* promoter gene. The percentages of CpGs that were methylated in MCF7 mock (blue), MCF7 FN-treated (red) and MCF7 recultured (green) were shown. C: ChIP quantitative PCR analysis. Ct values were normalized between target and endogenous control (*MMP2/GAPDH*) and the results of mock (blue), FN-treated (red) and recultured (green) cells are shown. At the bottom the samples are separated according to the antibody used in the immunoprecipitation. Statistical comparison was performed using Student's *t* Test. **p*<0.05. doi:10.1371/journal.pone.0105806.g002

essential role in the establishment of EMT in breast cancer cells [23]. Thus, the results of the demethylation of the *MMP2* gene promoter after culturing with fibronectin could represent a very important step for metastasis. The epigenetic event seems to be a key regulatory mechanism in the metastasis process [24] and the *MMP2* gene promoter appears to be a suitable target for DNA demethylation following fibronectin signaling.

MCF7 cells have a low migration rate and weak invasive activity [25]. Recently, ectopic overexpression of *MMP2* in MCF7 cells was shown to result in enhanced motility and invasiveness in breast [26], ovarian [27] and lung cancer cells [28]. In the present study, we found a statistically significant increase in cell migration of FN-treated MCF7 cells compared with mock cells in wound healing assays (Fig. 3). This result highlights a functional role of the FN-induced MMP-2 proteinase in MCF7, a non-invasive breast tumor cell line, connecting the *MMP2* promoter demethylation with a phenotypical change in tumor cells. In contrast, in the haptotaxis migration assays, FN-treated cells did not change the migratory

behavior toward FN or collagen type-I compared with mock cells (Fig. S3). One possible explanation to this apparent contradiction are the differences in cell preparation. While haptotaxis migration assays mandatorily require cell suspension and disruptions in the cell-cell and cell-ECM interactions, in wound healing assays cells migrate as a collective sheet in close contact with the substrate [29]. Moreover, an invasive assay mimicking the tumor three-dimensional architecture, known as MTS (multicellular tumor spheroids), was performed. However, no invasive phenotype was observed (Fig. S4), indicating that although FN promotes activation and secretion of MMP-2 by non-invasive MCF7 cells, the proposed treatment was not sufficient to make MCF7 fully invasive. We believe that other factors and players may have a combined role in this process.

The next step was to evaluate if the methylation pattern observed in FN-treated cells was transient or stable. We recultured the FN-treated cells for 48h in the absence of fibronectin and the *MMP2* expression significantly declined in this condition

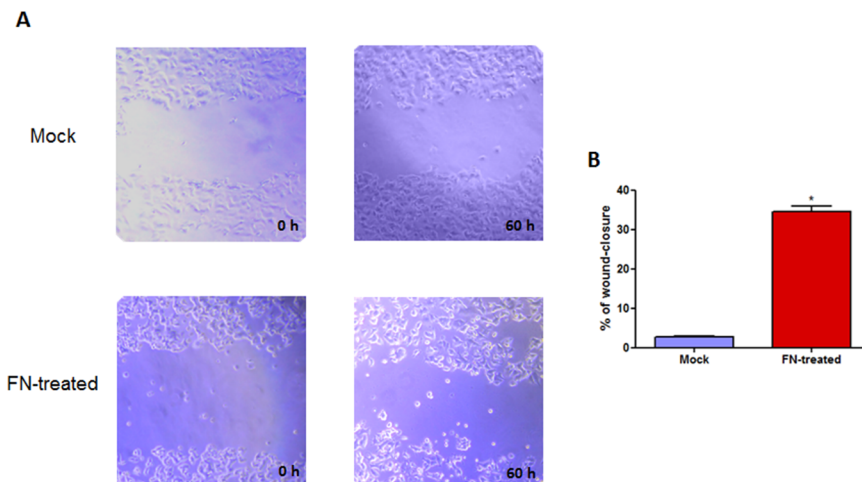


Figure 3. Wound healing assay in MCF7 cells. A: Representative images from mock and FN-treated cells were shown. The scratched cells in a line had images obtained under an inverted optical microscopy (20X). B: The graphic represents % of wound-closure after 60 h in culture. Statistical comparison was performed using Student's *t* Test. **p*<0.05. doi:10.1371/journal.pone.0105806.g003

(Fig. 1A). Interestingly, sequencing of the *MMP2* promoter revealed a global methylation of 77% (Fig. 2A), showing that the demethylation pattern observed in the FN-treated cells was transient. These results support the hypothesis that demethylation is a dynamic, rapid and transient process and that the gene was likely re-methylated when the stimulus was removed [30,31].

It has become increasingly clear that DNA methylation and histone lysine methylation systems are highly interrelated [32,33]. In order to study how this connection could be involved in the *MMP2* promoter in MCF7 cells, we performed the chromatin immunoprecipitation assays (ChIP) with MCF7 mock, FN-treated and recultured cells. The H3K27me3 was similar in all tested conditions, however the H3K4me3 open chromatin mark was significantly higher in the FN-treated condition and recultured cells (Fig. 2C). Recently, reviews discussed that H3K4me3 is associated with non-methylated DNA state in active gene promoters [32,33]. In contrast, the H3K27me3 is associated with repression of transcription and it seems to promote chromatin compaction [33]. Apparently, the H3K27me3 does not directly impair transcriptional reactivation but may be involved in providing imprints to facilitate subsequent gene silencing if the activating signal decays [34]. Many promoters in embryonic stem (ES) cells harbor a distinctive histone modification signature that combines the activating histone H3K4me3 mark and the repressive H3K27me3 mark. These bivalent domains are considered to poise expression of developmental genes, allowing timely activation while maintaining repression in the absence of differentiation signals [35]. The presence of both histone markers and DNA methylation patterns were recently studied in epithelial-mesenchymal transition (EMT) in Twist1 induced mammary epithelial cells [36]. Overall, the study showed that the number of genes marked by H3K4me3 and also by both H3K4me3 and H3K27me3 (bivalent) was increased following Twist1-induced EMT [36]. Besides, when DNA-hypermethylated genes were demethylated and reexpressed they adopted a bivalent chromatin pattern in colon cancer cells [37]. These reports can help explain the observed bivalent markers in the *MMP2* promoter FN-treated MCF7 cells.

Another important result was the re-methylation process observed in the recultured cells (Fig. 2A e 2B). A similar result was verified in colorectal carcinoma cells treated with 5-Aza [30]. The treated cells showed DNA demethylation of some genes and their reactivation, but the treatment was not able to resolve the bivalent chromatin. Interestingly, upon drug withdrawal, a re-methylation was reached [30]. Thus, it can be suggested that the presence of H3K27me3 can explain the rapid DNA re-methylation of *MMP2* in the absence of fibronectin. However, additional antibodies for other open and closed histone markers will be necessary to strengthen this hypothesis.

We propose that histone marks assist in the protection of gene methylation to ensure *MMP2* gene inactivation; however, these marks were not involved in the demethylation process. Thus, it appears that the dynamics of the DNA demethylation of the *MMP2* promoter region and the subsequent expression of the gene is an active and fast process. We provide the first evidence that a molecule -fibronectin- present in the tumor microenvironment is capable of inducing DNA demethylation and initiating changes in histone marks to activate an essential gene associated with metastasis.

Materials and Methods

Cell culture

The MCF7 and MDA-MB-435 and MDA-MB-436 cell lines were obtained from ATCC. Cells were cultured in RPMI 1640 medium (Gibco) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Gibco), 2 mM glutamine and 40 mg/mL gentamycin, following the protocol suggested by ATCC. For fibronectin treatment the cells were washed twice with PBS, trypsinized, centrifuged, and washed three times with RPMI without fetal bovine serum (FBS). After the washes, the cells were resuspended in RPMI without FBS and counted. Approximately 3×10^5 MCF7 cells were treated with fibronectin [10] (25 μ g/mL, Sigma Aldrich) or with serum-free medium (SFM) without fibronectin (mock) for 5 hours. The plates were incubated in a 37°C incubator with a 5% CO₂ atmosphere.

5-Aza-2'-deoxycytidine treatment

Approximately 3×10^5 MCF7 cells were treated with 1 μ M 5-aza-2'-deoxycytidine (5-Aza-treated) (Sigma Aldrich) [38]. The medium was changed every day for seven days, and no significant cell death was observed.

Quantitative Real-Time PCR for *MMP2* gene expression

RNA was extracted using the AllPrep kit (Qiagen) following the manufacturer's instructions. Complementary DNA was prepared from 500 ng RNA in a 20 μ L reaction volume containing 0.5 mM deoxyribonucleotide triphosphate, 1 μ M oligodT, 10 U RNasin (Promega) and Sensiscript reverse transcriptase with buffer (Qiagen). The negative control consisted of adding all the products needed for cDNA synthesis except the Sensiscript reverse transcriptase.

MMP2 gene was quantified by qPCR. The internal controls consisted of sequences for the genes *GAPDH* and *HPRT* (600 nM) [39]. For this assay, we performed an efficiency curve for each primer pair and sample diluent. The cell line MDA-MB-435, which expresses the *MMP2* gene, was used as a positive control. Real-Time PCR was performed with 1x SYBR Green (Applied Biosystems) on the StepOne Plus equipment (Applied Biosystems).

Metalloprotease activity by Zymography

The MMP-2 metalloproteinase activity was assessed using the zymography technique [40]. To evaluate MMP-2 activity, we used an 8% SDS-PAGE gel co-polymerized with 0.1% gelatin (Biorad). The conditioned serum-free medium (SFM) was concentrated with Sepharose-Gelatin resin (Sigma Aldrich) [10] and mixed with the electrophoresis buffer without reducing agents. After electrophoresis, the gel was washed in 2.5% Triton-X to completely remove SDS. Then, the gel was placed in incubation buffer (5 mM CaCl₂ and 1 mM ZnSO₄) at 37°C for approximately 48 hours. Discolored bands in the gel were visualized to quantify gelatinase activity [41].

Wound healing Assay

MCF7 mock or FN-treated cells (200,000 cells) were cultured in confluent monolayers in 24 well plates. The cells were serum depleted for 4 hours and the FN-treatment was done as described. The monolayers were wounded as a line across the well with the use of a 200 μ L pipette tip was made, then washed twice with serum free media to remove cell debris and incubated in a 37°C incubator with a 5% CO₂ atmosphere. The cell free wound area was photographed at the indicated times with a digital camera connected to an inverted microscope. Images were analyzed by Image J software. Wound healing was calculated as the proportion

of migrating cells compared with the initial wound area [29]. The results were obtained from three independent triplicate assays.

Transwell migration assay

The transwell plates (Costar) containing 8 μ m membranes were used for this assay. The lower chambers were pre-incubated with a solution of 20 μ g/mL type I collagen (BD Biosciences) in PBS (300 μ L/well). Before testing, the wells were washed twice with PBS and then maintained in RPMI without FBS at 4°C. After the treatments, cells were released from the plate with trypsin, and 4×10^4 cells in 100 μ L of RPMI (no FBS) were placed in the upper chamber of the transmigration well. The plate was then incubated in 5% CO₂ at 37°C for 14 hours. This technique was performed in duplicates and on two different days as a control for our treatment. The quantification of migratory cells was performed with DAPI (4', 6-diamino-2-phenylindole). After the migration (14 hours) the transwells were washed with 1x PBS, and the cells were fixed with 1% formaldehyde for 10 minutes at room temperature. After washing with PBS, the top chamber of each well was dried with the aid of a cotton swab. The cell nuclei were stained with DAPI (1:1000) for 5 minutes and washed 3 times in PBS. The number of cells in 20 optical fields independent of each experimental condition was evaluated in a fluorescence microscope (UV 330–338).

3D Invasion assay

Forty-eight-well plates were previously prepared with low melting agarose in 1% RPMI [42]. After 5 hours of treatment with fibronectin, 4×10^4 MCF7 cells in 500 μ L complete RPMI medium were plated onto multi-48-well containing a bottom layer of non-adherent 200 μ L low melting agarose and kept at 37°C, 5% CO₂ for 72 hours. After this period, the multicellular tumor spheroids (MTS) were transferred into new 48-well plates embedded on 400 μ L 2.5 mg/ml type I collagen solution (BD Biosciences) in the presence or absence of 20 μ g/mL fibronectin (Sigma) and incubated in a 37°C oven for 1 h. After this time 500 μ L of complete medium was added over the joint. After seven days of submersion, the process of invasion into 3D collagen layers was observed and monitored under an inverted microscope. As a positive control for spheroid formation, the invasive cell line MDA-MB-435 that highly expresses MMP-2 was used with the same experimental conditions.

Cloning and bisulfite sequencing of the CpG Island of the *MMP2* gene

Approximately 1 μ g of DNA extracted with All-Prep kit (Qiagen), was used for bisulfite treatment with the Epitect reagent (Qiagen) according to the manufacturer's specifications. The CpG island of the *MMP2* gene was amplified using the primers described previously [12], and the products were purified by 1% agarose gel electrophoresis using the Quick Extraction Protocols Kit (Qiagen). The purified products were then cloned into the pGEMT Easy vector (Promega) and electroporated into the *Escherichia coli* strain DH10B. Recombinant clones were selected by α -complementation. Plasmid DNA was extracted from at least eight clones using the QiaPrep kit (Qiagen). Approximately 300 to 500 ng of DNA were sequenced using the BigDye terminator kit on an XL Genetic Analyzer sequencer according to the manufacturer's instructions (Applied Biosystems).

Chromatin immunoprecipitation (ChIP)

MCF7 mock, FN-treated and recultured cells were used in this assay. After the cultures, the medium was aspirated and 1%

formaldehyde in 10 mL of PBS was added. After 10 min of incubation at 37°C, the reaction was stopped with 2.5 M glycine. Approximately 2.5 ml of scraping buffer (PBS containing 1x protease inhibitor cocktail) was added to the plate, and cells were scraped from the plastic surface. The cells were centrifuged at 800 \times g at 4°C for 10 min and the pellet cells were lysed by lysis buffer supplied by MAGnify ChIP System (Invitrogen). The lysates were sonicated with Covaris sonicator for 13 cycles of 60 sec (under the conditions Duty - 5% Intensity - 2 Cycles/Burst - 200) and centrifuged at 14,000 \times g for 10 min at 4°C. Then, the supernatant was divided into 4 aliquots and immunoprecipitated with H3K27me3, H3K4me3, H3 and IgG (negative control) antibodies at a concentration of 2 μ g/ml. The following steps were realized according to the MAGnify ChIP System (Invitrogen) manufacture's instructions. The samples were quantified using Nanodrop 2000 and subjected to qPCR analysis.

For the ChIP qPCR assay, the following controls were tested at 400 nM: *MYOD1* and *GAPDH* (Qiagen). To compare all the samples, the endogenous *GAPDH* gene was chosen. We used 25 ng of immunoprecipitated DNA in qPCR with SYBR Green (Applied Biosystems) mix. B1 primers were used as described [12].

Statistical analysis

A triplicate analysis was performed in all experiments, and values were analyzed by Student's *t* Test *t* and *p*<0.05 was considered significant.

Supporting Information

Figure S1 Zymography analysis of MMP-2 from MCF7 cells. M.M. molecular marker. PC, the breast tumor cell line MDA-MB-435 used as positive control. Mock; 5-Aza-treated and FN-treated. The bands correspond to the pro (72 kDa) and active (62 kDa) MMP-2 protein forms. (TIF)

Figure S2 Sequencing of the *MMP2* gene promoter in MDA-MB-436 cells. Closed and open circles represent methylated or unmethylated CpGs, respectively. On the left the number represent the sequenced clones. The 49 analyzed CpGs in the *MMP2* promoter region of mock and FN-treated are shown. The global methylation percentage is also shown at right. (TIF)

Figure S3 Migration assay after fibronectin treatment in MCF7 cells. Mock and FN-treated cells were submitted to a transwell haptotactic migration assay. The results consist of two independent experiments. No statistical differences were observed. (TIF)

Figure S4 Invasion assay after fibronectin assay in MCF7 cells. Mock and FN-treated cells were transferred into a framework of agarose to form spheroids for 72 h. These spheroids were transferred to a collagen-containing matrix with or without fibronectin. The invasion into collagen was monitored for seven days. MDA-MB-435 cells were used as a highly invasive control. (TIF)

Acknowledgments

We thank Roseli Prado and Valter Baura for technical assistance.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: GK ETC FFC. Performed the experiments: EASR ITP GCMM LMBK AC ETC. Analyzed the data:

AAC FFC EMS KBP GK. Contributed reagents/materials/analysis tools:
AAC EMS FOP. Wrote the paper: ITP EASR ETC FFC FOP GK.

References

1. Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A (2014) Cancer statistics, 2014. *CA: a cancer journal for clinicians* 64: 9–29.
2. INCA (2014) Incidência do câncer no Brasil. Estimativa 2014.
3. Duffy SW (2005) Some current issues in breast cancer screening. *Journal of medical screening* 12: 128–133.
4. Sethi N, Kang Y (2011) Unravelling the complexity of metastasis - molecular understanding and targeted therapies. *Nature reviews Cancer* 11: 735–748.
5. Chaffer CL, Weinberg RA (2011) A perspective on cancer cell metastasis. *Science* 331: 1559–1564.
6. Stamenkovic I (2000) Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. *Seminars in cancer biology* 10: 415–433.
7. Artacho-Cordon F, Rios-Arrabal S, Lara PC, Artacho-Cordon A, Calvente I, et al. (2012) Matrix metalloproteinases: potential therapy to prevent the development of second malignancies after breast radiotherapy. *Surgical oncology* 21: e143–151.
8. Stanton H, Gavrilovic J, Atkinson SJ, d'Ortho MP, Yamada KM, et al. (1998) The activation of ProMMP-2 (gelatinase A) by HT1080 fibrosarcoma cells is promoted by culture on a fibronectin substrate and is concomitant with an increase in processing of MT1-MMP (MMP-14) to a 45 kDa form. *Journal of cell science* 111 (Pt 18): 2789–2798.
9. Mitra A, Chakrabarti J, Banerji A, Das S, Chatterjee A (2006) Culture of human cervical cancer cells, SiHa, in the presence of fibronectin activates MMP-2. *Journal of cancer research and clinical oncology* 132: 505–513.
10. Das S, Banerji A, Frei E, Chatterjee A (2008) Rapid expression and activation of MMP-2 and MMP-9 upon exposure of human breast cancer cells (MCF-7) to fibronectin in serum free medium. *Life sciences* 82: 467–476.
11. Moroz A, Delella FK, Lacorte LM, Deffune E, Felisbino SL (2013) Fibronectin induces MMP2 expression in human prostate cancer cells. *Biochemical and biophysical research communications* 430: 1319–1321.
12. Chernov AV, Sounni NE, Remacle AG, Strongin AY (2009) Epigenetic control of the invasion-promoting MT1-MMP/MMP-2/TIMP-2 axis in cancer cells. *The Journal of biological chemistry* 284: 12727–12734.
13. Chik F, Szyf M (2011) Effects of specific DNMT gene depletion on cancer cell transformation and breast cancer cell invasion; toward selective DNMT inhibitors. *Carcinogenesis* 32: 224–232.
14. Berger SL (2007) The complex language of chromatin regulation during transcription. *Nature* 447: 407–412.
15. Wan L, Pantel K, Kang Y (2013) Tumor metastasis: moving new biological insights into the clinic. *Nature medicine* 19: 1450–1464.
16. Lelievre SA (2009) Contributions of extracellular matrix signaling and tissue architecture to nuclear mechanisms and spatial organization of gene expression control. *Biochimica et biophysica acta* 1790: 925–935.
17. Ioachim E, Charchanti A, Briasoulis E, Karavasili V, Tsanou H, et al. (2002) Immunohistochemical expression of extracellular matrix components tenascin, fibronectin, collagen type IV and laminin in breast cancer: their prognostic value and role in tumour invasion and progression. *European journal of cancer* 38: 2362–2370.
18. Helleman J, Jansen MP, Ruigrok-Ritstier K, van Staveren IL, Look MP, et al. (2008) Association of an extracellular matrix gene cluster with breast cancer prognosis and endocrine therapy response. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* 14: 5555–5564.
19. Carraher CL, Schwarzbauer JE (2013) Regulation of matrix assembly through rigidity-dependent fibronectin conformational changes. *The Journal of biological chemistry* 288: 14805–14814.
20. Polyak K, Weinberg RA (2009) Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nature reviews Cancer* 9: 265–273.
21. Miettinen PJ, Ebner R, Lopez AR, Derynck R (1994) TGF-beta induced transdifferentiation of mammary epithelial cells to mesenchymal cells: involvement of type I receptors. *The Journal of cell biology* 127: 2021–2036.
22. Kalluri R, Weinberg RA (2009) The basics of epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of clinical investigation* 119: 1420–1428.
23. Park J, Schwarzbauer JE (2013) Mammary epithelial cell interactions with fibronectin stimulate epithelial-mesenchymal transition. *Oncogene*.
24. Tam WL, Weinberg RA (2013) The epigenetics of epithelial-mesenchymal plasticity in cancer. *Nature medicine* 19: 1438–1449.
25. Hurtubise A, Mompalmer RL (2006) Effect of histone deacetylase inhibitor LAQ824 on antineoplastic action of 5-Aza-2'-deoxycytidine (decitabine) on human breast carcinoma cells. *Cancer chemotherapy and pharmacology* 58: 618–625.
26. Ni X, Xia T, Zhao Y, Zhou W, Wu N, et al. (2014) Downregulation of miR-106b induced breast cancer cell invasion and motility in association with overexpression of matrix metalloproteinase 2. *Cancer science* 105: 18–25.
27. Kenny HA, Kaur S, Coussens LM, Lengyel E (2008) The initial steps of ovarian cancer cell metastasis are mediated by MMP-2 cleavage of vitronectin and fibronectin. *The Journal of clinical investigation* 118: 1367–1379.
28. Meng XN, Jin Y, Yu Y, Bai J, Liu GY, et al. (2009) Characterisation of fibronectin-mediated FAK signalling pathways in lung cancer cell migration and invasion. *British journal of cancer* 101: 327–334.
29. Liang CC, Park AY, Guan JL (2007) In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nature protocols* 2: 329–333.
30. Mayor R, Munoz M, Coolen MW, Custodio J, Esteller M, et al. (2011) Dynamics of bivalent chromatin domains upon drug induced reactivation and resiliency in cancer cells. *Epigenetics: official journal of the DNA Methylation Society* 6: 1138–1148.
31. Kagey JD, Kapoor-Vazirani P, McCabe MT, Powell DR, Vertino PM (2010) Long-term stability of demethylation after transient exposure to 5-aza-2'-deoxycytidine correlates with sustained RNA polymerase II occupancy. *Molecular cancer research: MCR* 8: 1048–1059.
32. Rothbart SB, Strahl BD (2014) Interpreting the language of histone and DNA modifications. *Biochimica et biophysica acta*.
33. Rose NR, Klose RJ (2014) Understanding the relationship between DNA methylation and histone lysine methylation. *Biochimica et biophysica acta*.
34. McGarvey KM, Fahrner JA, Greene E, Martens J, Jenuwein T, et al. (2006) Silenced tumor suppressor genes reactivated by DNA demethylation do not return to a fully euchromatic chromatin state. *Cancer research* 66: 3541–3549.
35. Voigt P, Tee WW, Reinberg D (2013) A double take on bivalent promoters. *Genes & development* 27: 1318–1338.
36. Malouf GG, Taube JH, Lu Y, Roysarkar T, Panjarian S, et al. (2013) Architecture of epigenetic reprogramming following Twist1-mediated epithelial-mesenchymal transition. *Genome biology* 14: R144.
37. McGarvey KM, Van Neste L, Cope L, Ohm JE, Herman JG, et al. (2008) Defining a chromatin pattern that characterizes DNA-hypermethylated genes in colon cancer cells. *Cancer research* 68: 5753–5759.
38. Prybylkowski P, Obajimi O, Keen JC (2007) Trichostatin A and 5 Aza-2' deoxycytidine decrease estrogen receptor mRNA stability in ER positive MCF7 cells through modulation of HuR. *Breast Cancer Res Treat* 111: 15–25.
39. Figueira RC, Gomes LR, Neto JS, Silva FC, Silva ID, et al. (2009) Correlation between MMPs and their inhibitors in breast cancer tumor tissue specimens and in cell lines with different metastatic potential. *BMC cancer* 9: 20.
40. Kleiner DE, Stedler-Stevenson WG (1994) Quantitative zymography: detection of picogram quantities of gelatinases. *Analytical biochemistry* 218: 325–329.
41. Leber TM, Balkwill FR (1997) Zymography: a single-step staining method for quantitation of proteolytic activity on substrate gels. *Analytical biochemistry* 249: 24–28.
42. Ivascu A, Kubies M (2007) Diversity of cell-mediated adhesions in breast cancer spheroids. *International journal of oncology* 31: 1403–1413.

Supporting Information

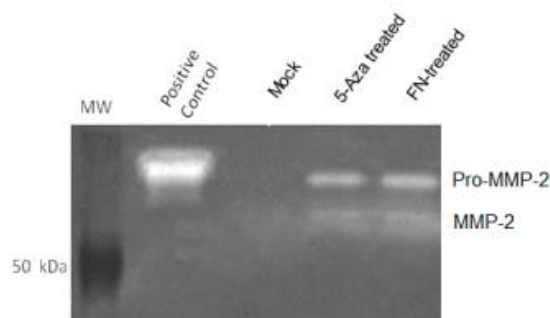


Figure S1 Zymography analysis of MMP-2 from MCF7 cells. M.M. molecular marker. PC, the breast tumor cell line MDA-MB-435 used as positive control. Mock; 5-Aza-treated and FN-treated. The bands correspond to the pro (72 kDa) and active (62 kDa) MMP-2 protein forms.

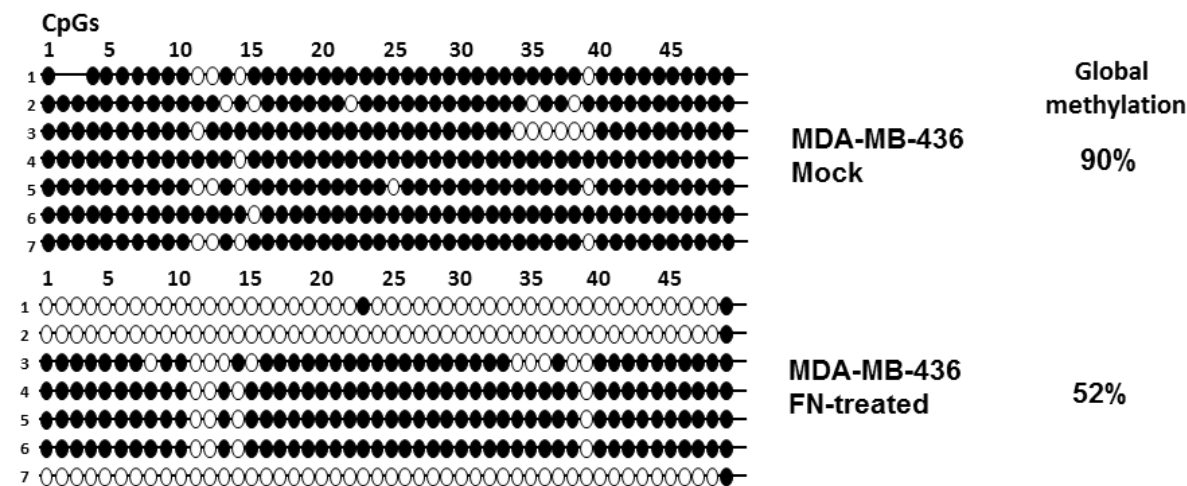


Figure S2 Sequencing of the MMP2 gene promoter in MDA-MB-436 cells. Closed and open circles represent methylated or unmethylated CpGs, respectively. On the left the number represent the sequenced clones. The 49 analyzed CpGs in the MMP2 promoter region of mock and FN-treated are shown. The global methylation percentage is also shown at right.

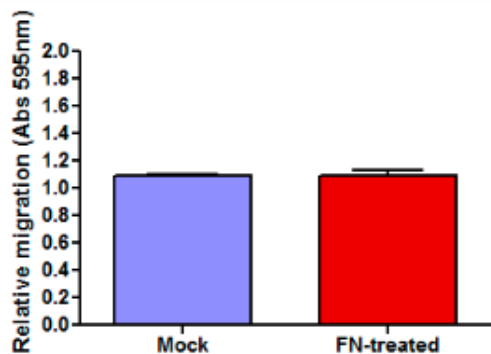


Figure S3 Migration assay after fibronectin treatment in MCF7 cells. Mock and FN-treated cells were submitted to a transwell haptotactic migration assay. The results consist of two independent experiments. No statistical differences were observed.

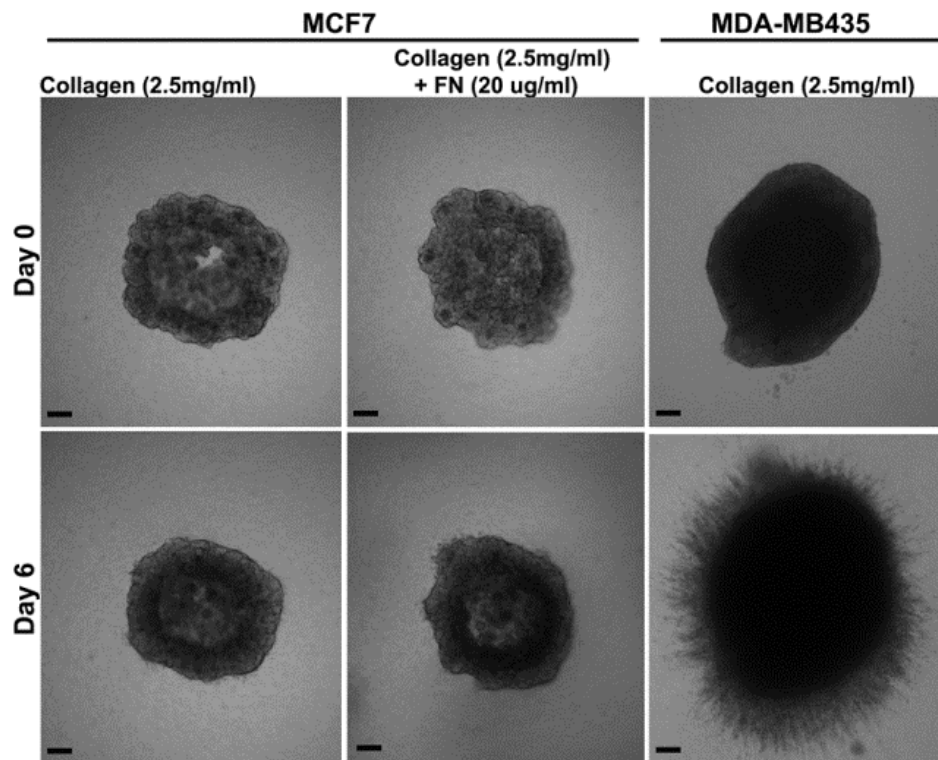


Figure S4 Invasion assay after fibronectin assay in MCF7 cells. Mock and FN-treated cells were transferred into a framework of agarose to form spheroids for 72 h. These spheroids were transferred to a collagen-containing matrix with or without fibronectin. The invasion into collagen was monitored for seven days. MDA-MB-435 cells were used as a highly invasive control.

CAPÍTULO II

Regulação epigenética do gene *MMP2* diante da exposição à fibronectina em linhagens tumorais de mama

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da fibronectina sobre os mecanismos epigenéticos que regulam a expressão do gene *MMP2* em linhagens tumorais de mama ao longo de uma maior exposição temporal

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudar o padrão de expressão do gene *MMP2* após o cultivo das linhagens com fibronectina em diferentes tempos de incubação (8, 12 e 24 horas), bem como do recultivo das células tratadas através de PCR quantitativo;
- Clonar e sequenciar a ilha de CpG do promotor do gene *MMP2* das linhagens tumorais de mama após o cultivo com fibronectina e o recultivo das células tratadas;
- Avaliar as modificações de histonas H3K4me3 e H3K27me3 associadas ao promotor do gene *MMP2* e correlaciona-las com perfil de metilação desse gene
- Avaliar o potencial migratório das células após os tratamentos utilizando os ensaios de *wound healing* e migração haptotática

4 METODOLOGIA

4.4 MATERIAL BIOLÓGICO

As linhagens celulares que foram utilizadas nesse projeto foram cedidas pelo Instituto Ludwig de pesquisa para o câncer - SP e são provenientes de diferentes tipos anatomopatológicos de tumores de mama: MCF7 e MDA-MB-436. Estas linhagens são não-invasivas e foram escolhidas devido a ausência de expressão do gene *MMP2* ou baixa expressão, respectivamente. Os cultivos das linhagens foram realizados em meio RPMI 1640 (Gibco) suplementado com soro fetal bovino (SFB) (Gibco) 10%, 2 mM de glutamina e garamicina 40 µg/ml, e incubados em estufa 37°C com atmosfera de 5% de CO₂.

4.5 CULTIVO COM FIBRONECTINA E RECULTIVO

Foram cultivadas aproximadamente 1×10^6 células por ensaio. Após o cultivo, as células foram lavadas duas vezes com PBS 1x, tripsinizadas e lavadas três vezes com meio RPMI sem soro fetal bovino (SFB). Então, as células foram ressuspensas em meio RPMI sem SFB. Cerca de 3×10^5 células foram adicionadas a 3 poços de 35 mm² contendo 40 µg/ml de fibronectina (FN) (Gibco) e meio RPMI sem SFB (DAS *et al.*, 2008). Como controle, as células foram cultivadas do mesmo modo, na ausência de FN. As placas foram incubadas durante diferentes tempos (8, 12 e/ou 24 horas) em estufa 37°C, com atmosfera de 5% de CO₂. Após o tratamento, as células foram tripsinizadas, lavadas com meio isento de SFB e cerca de 1×10^5 foram mantidas em condições de cultivo padrão sem FN, a fim de se avaliar a estabilidade das possíveis modificações (recultivo). As culturas foram submetidas à extração de DNA e RNA utilizando o *AllPrep Kit* (Qiagen).

4.6 AVALIAÇÃO DO PADRÃO DE EXPRESSÃO DO GENE *MMP2* EM LINHAGENS DE MAMA

Após a quantificação do RNA total, o mesmo foi submetido a síntese de cDNA utilizando a transcriptase reversa *High Capacity* (Applied Biosystems) seguindo recomendações do fabricante. Como controle da síntese de cDNA foi utilizado o gene

de expressão constitutiva *GAPDH*. A técnica de RT-PCR foi realizada utilizando-se iniciadores específicos para o gene *MMP2* e as condições de amplificação estão descritos no Anexo I. Esta metodologia foi utilizada como um experimento preliminar para verificar a expressão do gene, assim como a eficiência da síntese do cDNA.

A quantificação da expressão do gene *MMP2* foi feita utilizando o reagente *SYBR®Green* (Applied Biosystems) e o equipamento *StepOne Plus* (Applied Biosystems). Os iniciadores para o gene constitutivo *HPRT*, que foi utilizado como normalizador neste ensaio, e para o gene alvo *MMP2* estão descritos no Anexo I. O controle negativo consistiu da adição de todos os produtos necessários para a síntese do cDNA, exceto a enzima transcriptase reversa. Verificada a eficiência dos iniciadores, foi definida a concentração dos iniciadores (600 nM) e o volume de amostra (1 µL) para o ensaio. Para o cálculo dos resultados, o valor de Ct obtido da amplificação do transcrito de *MMP2* foi descontado dos valores de Ct do normalizador e aplicados na fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$ (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001). Os valores obtidos foram avaliados pelo teste estatístico *t de Student* e considerados significativos quando $p < 0,05$.

4.7 CLONAGEM E SEQUENCIAMENTO DA ILHA DE CpG DO GENE *MMP2*

4.7.3 Tratamento de DNA com bissulfito de sódio

As amostras de DNA obtidas das linhagens celulares foram submetidas ao tratamento com bissulfito de sódio utilizando os reagentes do protocolo *Epitect* (Qiagen) de acordo com as especificações do fabricante. A eficiência dessa técnica foi verificada através de uma reação de *nested-PCR* (duas reações com diferentes condições de estringência) para a sequência satélite SATR-1 (Anexo II) (COSTA *et al.*, 2006).

4.7.4 Clonagem da ilha de CpG do gene *MMP2* de linhagens celulares de mama

A partir das amostras de DNA tratadas com bissulfito de sódio (item 4.4.1), a ilha de CpG do gene *MMP2* foi amplificada (iniciadores descritos no Anexo III) e os produtos purificados a partir da eletroforese em gel de agarose 1% utilizando o protocolo *Quick Gel Extration Kit Protocols* (Qiagen). Os produtos purificados foram

em seguida clonados no vetor *pGEMT*®easy (Promega) e eletroporados em estirpe de *Escherichia coli* DH10B. Os clones recombinantes foram selecionados por alfa-complementação e submetidos à reação de PCR da colônia para a confirmação da presença do inserto. Os clones positivos foram cultivados e submetidos à extração de DNA plasmidial utilizando o *kit QiaPrep* (Qiagen). Cerca de 300 a 500 ng de cada preparação foram sequenciados utilizando-se *kit Big Dye terminator* no sequenciador XL *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems).

4.8 IMUNOPRECIPITAÇÃO DE CROMATINA – ChIP

As linhagens MCF7 e MDA-MB-436 (5×10^6 células) cultivadas sob diferentes condições foram fixadas com PBS 1x contendo formaldeído 1%. Após a incubação por 10 min a 37°C, 400 µL de glicina 2,5 M foram adicionados e a placa foi incubada por 5 min em temperatura ambiente. Em seguida, as células foram lavadas 3 x com 9 ml de PBS 1x gelado e raspadas. As células foram lisadas com tampão de lise (Invitrogen) e o lisado foi submetido à sonicação no equipamento *Covaris*® por 13 ciclos de 60 segundos (condições: Duty - 5% Intensity - 2 Cycles / Burst - 200). As amostras foram então divididas em quatro alíquotas e imunoprecipitadas com anticorpos específicos para H3, H3K27me3, H3K4me3 e IgG (controle negativo) (2 µg/ml). As etapas seguintes foram realizadas utilizando o protocolo do *kit MAGnify ChIP System* (Invitrogen) seguindo as recomendações do fabricante. A quantificação dos produtos de amplificação do promotor do gene *MMP2* foi feita através da técnica de qPCR, utilizando-se o reagente *SYBR*®*Green* (Applied Biosystems) e o equipamento *StepOne Plus* (Applied Biosystems). Os iniciadores utilizados nas reações estão descritos no Anexo IV. O gene constitutivo *GAPDH* (iniciadores Qiagen) foi utilizado como normalizador.

4.9 ENSAIOS DE POTENCIAL MIGRATÓRIO

4.9.3 Ensaio de *Wound healing*

Células das linhagens MCF7 e MDA-MB-436 foram tratadas com fibronectina e crescidas em placas de 24 poços. As células foram depletadas de soro fetal bovino (SFB) por 4 horas e uma abertura em linha reta através da monocamada celular

(“ferida”) foi feita utilizando uma ponteira de 200 µl. O poço foi lavado três vezes com RPMI sem SFB para retirada de células mortas, e as células incubadas em estufa a 37°C e %5 de CO₂. A área da abertura foi fotografada e mensurada utilizando o software ImageJ® nos tempos 0 e 60 horas para análise da migração celular (LIANG *et al.*, 2007).

4.9.4 Ensaio de Migração haptotática

As câmaras inferiores de placas de 24 poços de *transwell* (Costar®) contendo membranas com poros de 8 µm foram incubadas com uma solução de 20 µg/ml de colágeno tipo I (BD Biosciences) em PBS (300 µl/poço) 16 h antes do ensaio. Então, os poços foram lavados (2x com PBS 1x) e os *transwells* mantidos em meio RPMI sem SFB a 4°C. Após o período de tratamento com ou sem fibronectina, uma suspensão de 4×10^4 de células em 100 µl de RPMI (sem SFB) foi colocada na câmara superior do poço de transmigração. Na câmara inferior, junto ao colágeno previamente adicionado, foram acrescidos 600 µl de RPMI completo. A placa foi incubada em estufa de CO₂ 5%, 37°C por aproximadamente 14h. Para visualização e quantificação das células migratórias foram utilizados o corante fluorescente de DNA, DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol), e/ou uma solução de cristal violeta 0,1% (p/v) com metanol 20%.

5 RESULTADOS

5.4 ANÁLISE *IN SILICO* DO GENE *MMP2*

O gene *MMP2* localiza-se no cromossomo 16q13-q21, possui 31017 pb e 13 éxons. A Figura 3 co-localiza a região transcrita do gene (mRNA) no cromossomo 16, bem como a ilha de CpG alvo desse estudo.

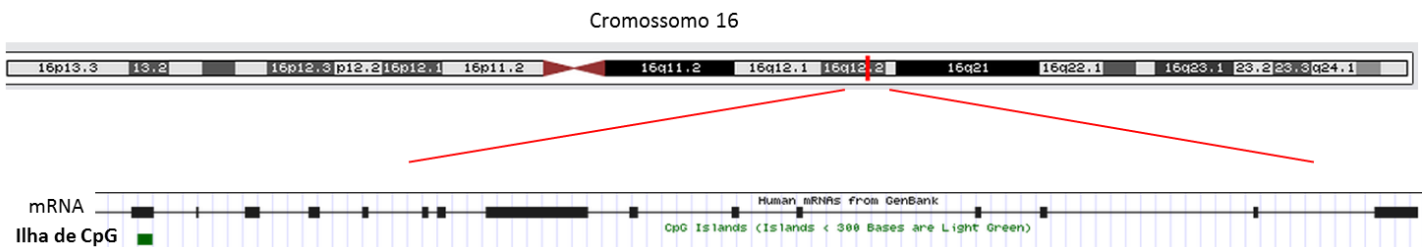


FIGURA 3 – LOCALIZAÇÃO DO GENE *MMP2*. O gene *MMP2* está localizado no cromossomo 16 (16q13-q21). O mRNA e a ilha de CpG que foi estudada encontram-se destacados na figura. Fonte: Adaptado do software BLAT (disponível em <http://genome.ucsc.edu/FAQ/FAQblat.html>)

A região compreendendo 2550 pares de bases, que engloba desde a região promotora até o início do primeiro exon, foi avaliada para o gene *MMP2* utilizando o programa *Methprimer* (Figura 4).

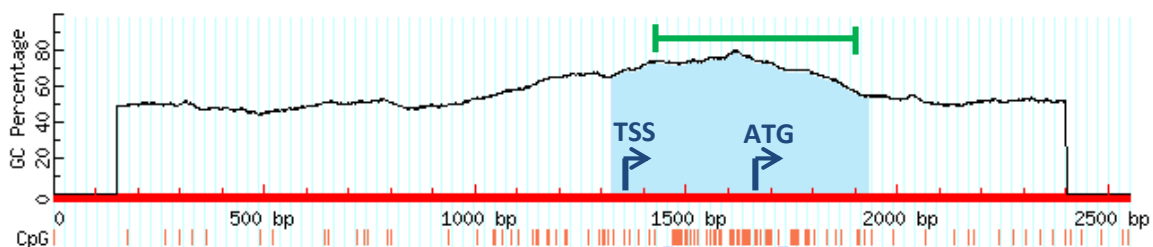


FIGURA 4 - ILHAS DE CpG DO GENE *MMP2*. Gráfico representativo da ilha de CpG presente na região promotora dentro da região avaliada (1,5 kb a montante e 1,5 kb jusante do início de transcrição do gene *MMP2*). O traço verde destaca a região que foi avaliada nesse estudo. As flechas localizam o início de transcrição do gene (TSS) e o início de tradução (códon ATG). Fonte: Adaptado de *Methprimer* (disponível em <http://www.urogene.org/methprimer/>).

A região escolhida compreende uma sequência de 396 pares de bases que contém 49 dinucleotídeos CpG e está destacada com um traço verde na Figura 4. Esta ilha está posicionada entre os nucleotídeos + 111 e + 446 e contém o início de tradução (códon ATG). Na Figura 5 pode ser visualizada a sequência da ilha de CpG analisada e a localização dos iniciadores para a amplificação.

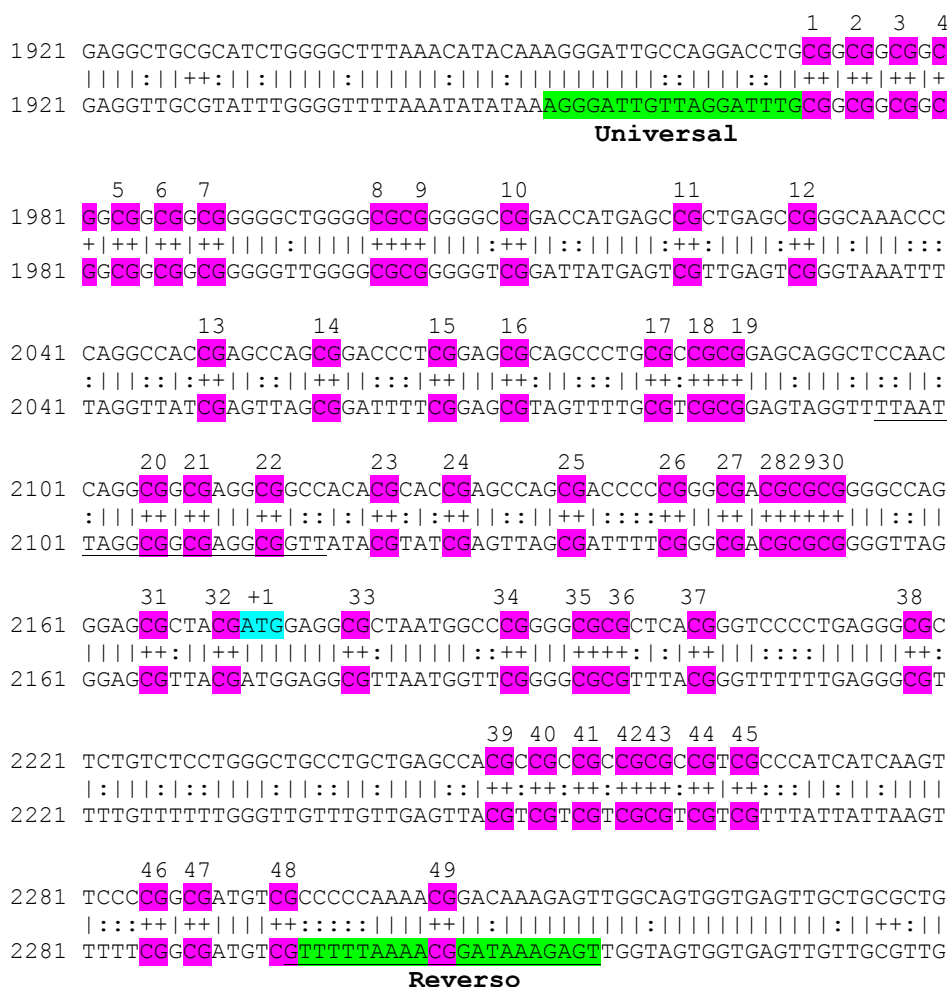


FIGURA 5 - ILHA DE CPG DO GENE *MMP2* AMPLIFICADA POR PCR. Sequência de DNA obtida com auxílio do programa *Methprimer*. Em verde encontram-se os iniciadores desenhados para a PCR, em rosa destacam-se os CGs presentes na sequência e em azul, destaca-se o ATG correspondente ao início de tradução. Os sublinhados localizam os iniciadores utilizados por Chernov *et al*, 2009.

5.5 TRATAMENTO DAS LINHAGENS MCF7 E MDA-MB-436 COM FIBRONECTINA (FN)

Células da linhagem MCF7 foram submetidas a diferentes condições de cultivo: 1) em meio RPMI sem SFB (controle); 2) em meio RPMI sem SFB com 40 µg/ml de fibronectina (Gibco) por 8,12 e 24 horas; 3) após o tratamento das células com FN, parte das células foi mantida em cultivo em meio RPMI sem FN por 48 horas (recultivo).

As células da linhagem MDA-MB-436 foram mantidas em meio RPMI sem SFB por 24h. Isso foi feito tendo em vista que essa linhagem apresenta diferenças na expressão e metilação quando cultivada em meio contendo SFB (Anexo V). Em

seguida, as células foram submetidas a diferentes condições de cultivo: 1) em meio RPMI sem SFB (controle); 2) em meio RPMI sem SFB com 40 µg/ml de fibronectina (Gibco) por 24 horas; 3) após o tratamento das células com FN, parte das células foi mantida em cultivo em meio RPMI sem FN por 48 horas (recultivo).

Após cada uma das diferentes condições testadas, o sobrenadante dos cultivos (meio condicionado) foi coletado e as células foram submetidas à extração de DNA e RNA.

5.6 EXPRESSÃO DE *MMP2* INDUZIDA POR FIBRONECTINA

A linhagem MCF7 não expressa *MMP2* (RAMOS, 2013), entretanto, após o cultivo com a FN por 8, 12 e 24 horas, a expressão do gene foi observada e quantificada, apresentando um aumento de 7, 25 e 9 vezes, respectivamente, quando comparado com as células não tratadas (mock) (Figura 6). O tratamento por 12 horas apresentou o maior aumento na expressão, estatisticamente diferente de todas as outras condições de cultivo. As células que foram mantidas em cultivo após o tratamento com FN (recultivo) também apresentaram um aumento significativo (5 vezes) na expressão de *MMP2* quando comparadas com as células não tratadas, e sem diferença estatística entre eles (Figura 6). A atividade da MMP-2 também pôde ser observada após os tratamentos através da técnica de zimografia (dados não mostrados).

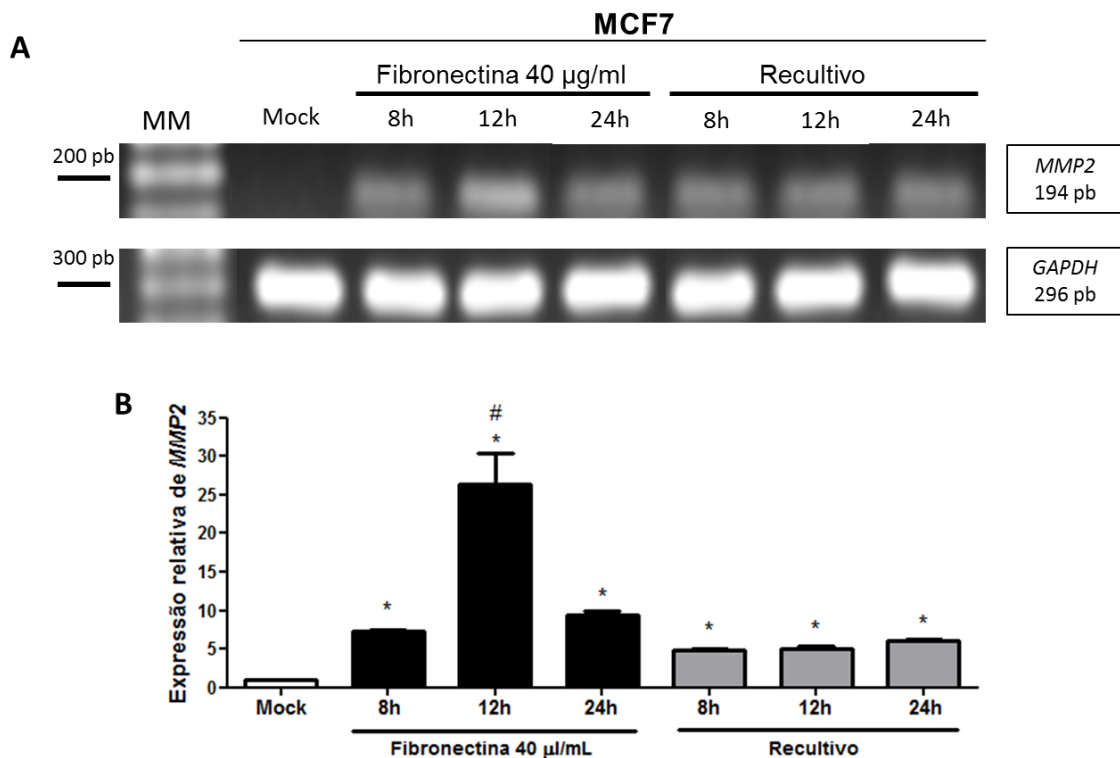


FIGURA 6 - EXPRESSÃO DO GENE *MMP2* NA LINHAGEM MCF7. (A) RT-PCR dos genes *MMP2* e *GAPDH*. Marcador de massa molecular (MM). Para o gene *MMP2* o tamanho do fragmento esperado é de 194 pb, e para o gene *GAPDH* o fragmento esperado é de 296 pb. (B) Expressão relativa do gene *MMP2* expressa por $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Linhagem MCF7 sem fibronectina (mock), tratada com fibronectina (40 µg/ml) por 8, 12 e 24 horas e recultivada depois dos tratamentos. O * representa $p < 0,05$ quando comparados com mock. O # representa $p < 0,05$ quando o tratamento 12h foi comparado aos demais grupos.

A linhagem MDA-MB-436 expressa baixos níveis de *MMP2* na condição livre de SFB, contudo, após o cultivo com a FN por 24 horas, a expressão do gene também teve um aumento significativo de 2,5 vezes quando comparado com as células não tratadas (mock) (Figura 7). As células recultivadas após o tratamento com FN apresentaram a expressão de *MMP2* quatro vezes maior quando comparadas com as células não tratadas, porém esse valor não foi significativamente diferente das células do tratamento (Figura 7).

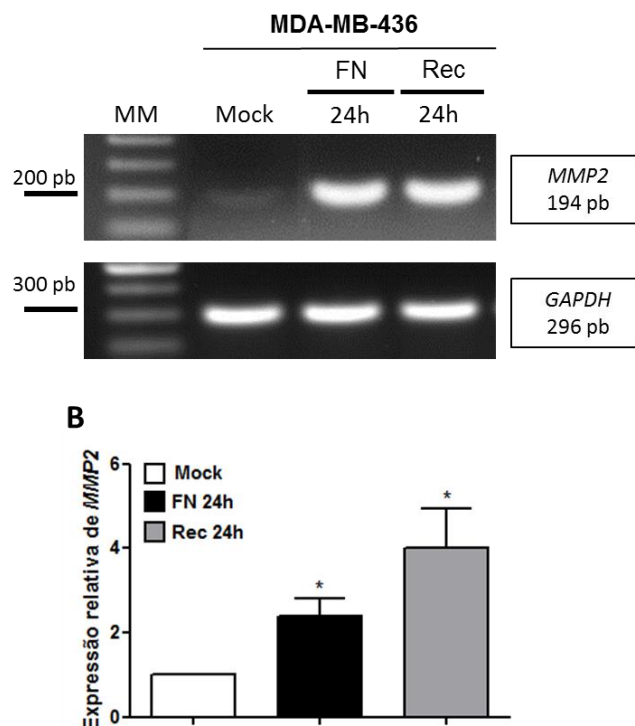


FIGURA 7 - EXPRESSÃO DO GENE *MMP2* NA LINHAGEM MDA-MB-436. (A) RT-PCR dos genes *MMP2* e *GAPDH*. Marcador de massa molecular (MM). Para o gene *MMP2* o tamanho do fragmento esperado é de 194 pb, e para o gene *GAPDH* o fragmento esperado é de 296 pb. (B). Expressão relativa do gene *MMP2* expressa por $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Linhagem MDA-MB-436 sem fibronectina (mock), tratada com fibronectina (40 μ g/ml) por 24 horas e recultivada depois do tratamento. O * representa $p < 0,05$ quando comparados com mock.

5.7 CLONAGEM E SEQUENCIAMENTO DA ILHA DE CpG DO GENE *MMP2* APÓS O CULTIVO COM FIBRONECTINA

As amostras de DNA obtidas do cultivo das linhagens MCF7 e MDA-MB-436 tratadas com FN e seus recultivos foram submetidas ao tratamento com bissulfito de sódio. A ilha de CpG do gene *MMP2* das linhagens sob as diferentes condições de cultivo foi amplificada e os produtos purificados a partir da eletroforese em gel de agarose 1% (Figuras 8 e 9).

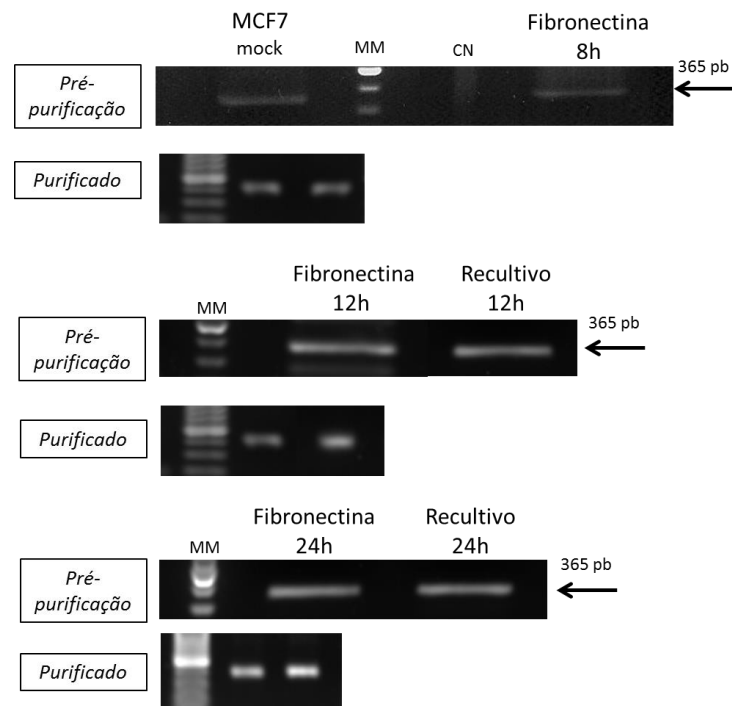


FIGURA 8 – AMPLIFICAÇÃO E PURIFICAÇÃO DA ILHA DE CpG DO GENE *MMP2* NA LINHAGEM MCF7 SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTIVO. Marcador molecular (MM) de 100 pb. Fragmento esperado de 365 pb. CN corresponde ao controle negativo da reação.

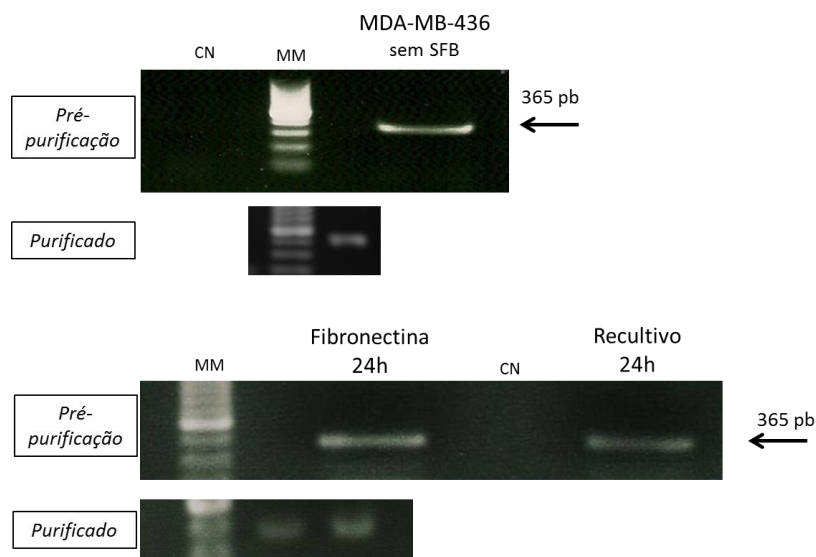


FIGURA 9 – AMPLIFICAÇÃO E PURIFICAÇÃO DA ILHA DE CpG DO GENE *MMP2* NA LINHAGEM MDA-MB-436 SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTIVO. Marcador molecular (MM) de 100 pb. Fragmento esperado de 365 pb. CN corresponde ao controle negativo da reação.

Os resultados do sequenciamento dos tratamentos com a linhagem MCF7 podem ser vistos na Figura 10.

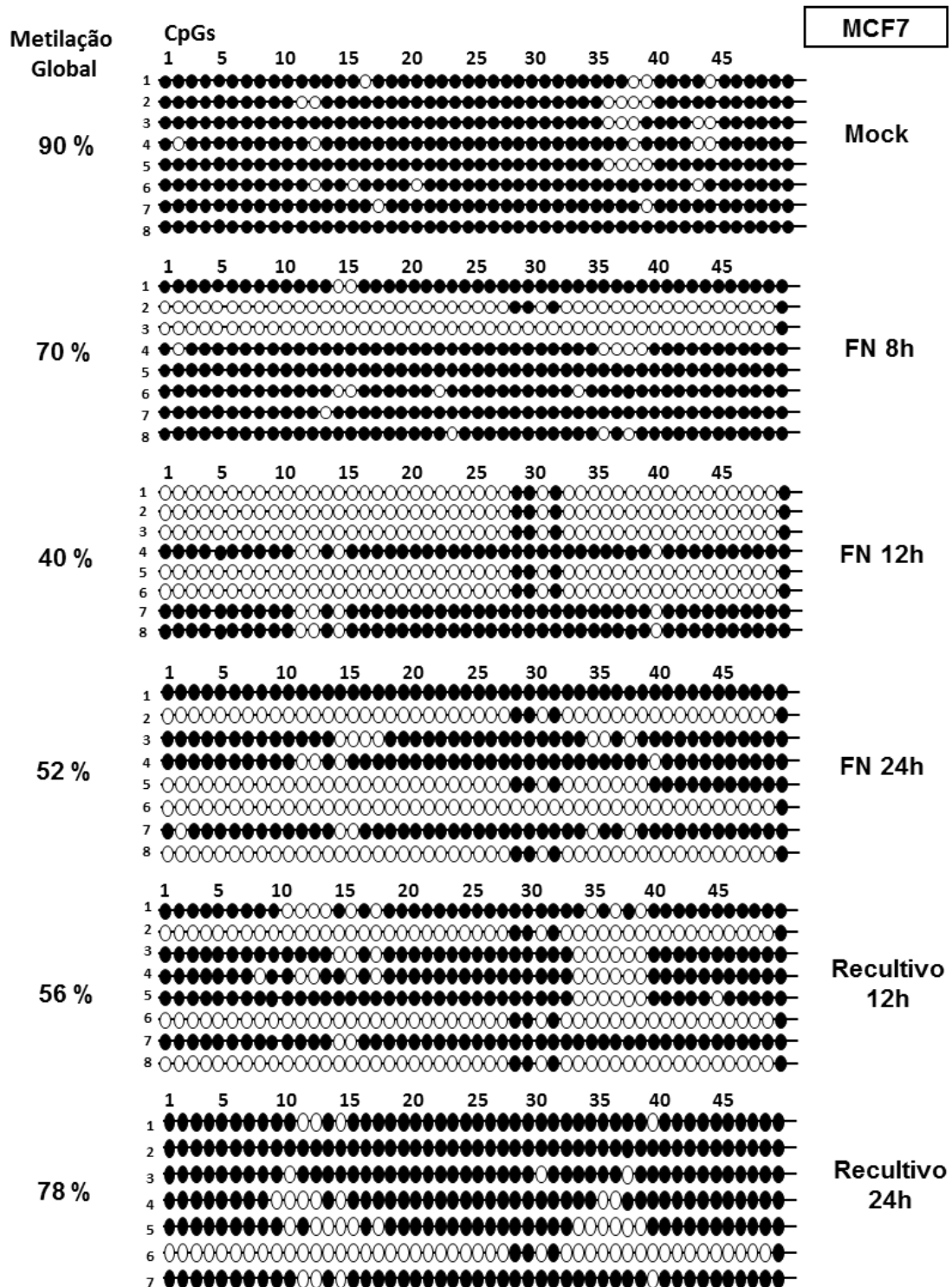


FIGURA 10 – PERFIL DE METILAÇÃO DA ILHA DE CpG DO GENE *MMP2* DA LINHAGEM MCF7. À esquerda estão as porcentagens de metilação global correspondentes as diferentes condições de tratamento. Mock (sem tratamento) (PEREIRA *et al.*, 2014); cultivo com fibronectina por 8h (FN 8h), 12h (FN 12h) e 24h (FN 24h); recultivos após os tratamentos com fibronectina de 12h (Recultivo 12h) e de 24h (Recultivo 24h). Cada linha representa um clone e cada dinucleotídeo CpG (49) está representado por um círculo, sendo que os círculos pretos representam as citosinas metiladas, e os círculos brancos, as citosinas não metiladas.

Após os tratamentos de 8, 12 e 24 horas com fibronectina (40 µg/ml) houve a desmetilação parcial do promotor do gene *MMP2*, onde a metilação global caiu de 90% para 70%, 40% e 52%, respectivamente (Figura 10). As células que foram recultivadas na ausência de fibronectina apresentaram um aumento na metilação do promotor quando comparadas com as células logo após o tratamento com fibronectina. A metilação global das células recultivadas após o tratamento de 12 horas com fibronectina passou de 40% para 56%; enquanto que, após o tratamento de 24 horas, passou de 52% para 78% (Figura 10).

O efeito da fibronectina sobre o perfil de metilação do gene *MMP2* também foi observado na linhagem MDA-MB-436. Células submetidas à condição livre de SFB por 24h apresentaram uma metilação global de 90% do promotor. Após o tratamento de 24 horas com fibronectina (40 µg/ml), a metilação caiu para 22% e no recultivo, aumentou para 28% (Figura 11).

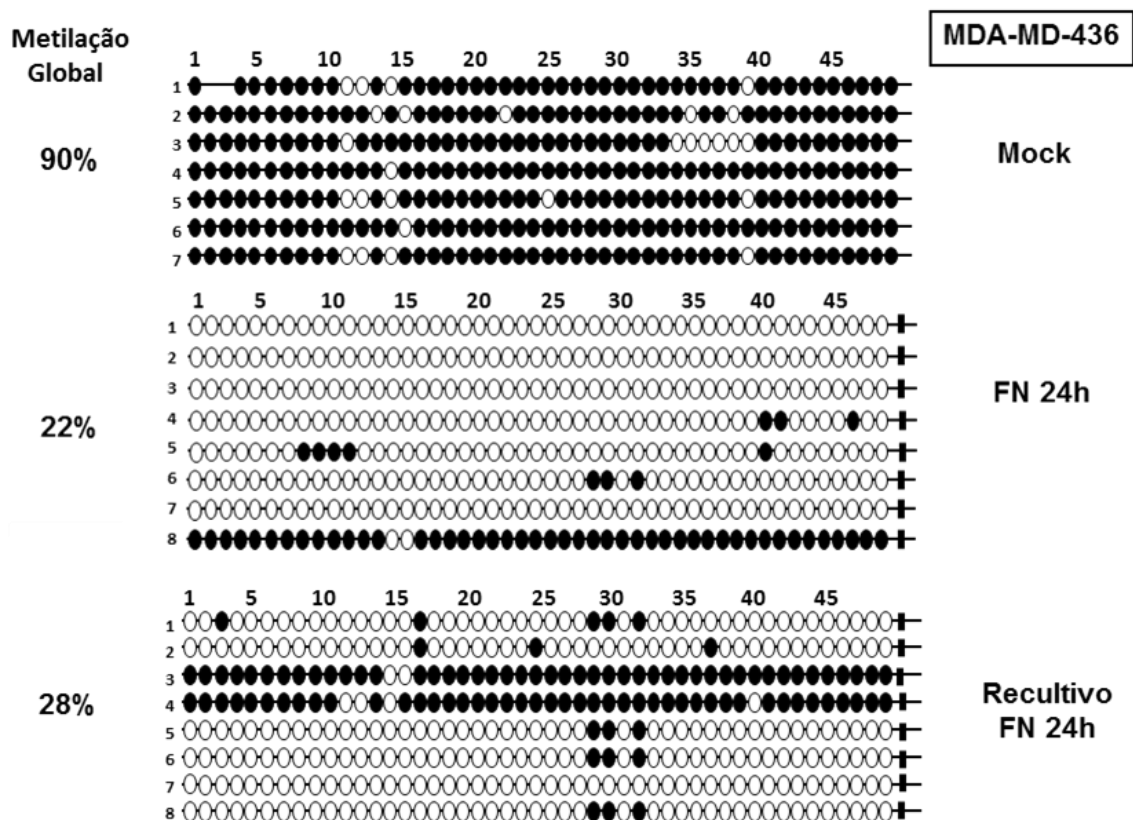


FIGURA 11 – PERFIL DE METILAÇÃO DA ILHA DE CpG DO GENE *MMP2* DA LINHAGEM MDA-MB-436. À esquerda estão as porcentagens de metilação global correspondentes às diferentes condições de tratamento. Mock (sem tratamento); cultivo com fibronectina por 24h (FN 24h); recultivo após o tratamento com fibronectina de 24h (Recultivo 24h). Cada linha representa um clone e cada dinucleotídeo CpG (49) está representado por um círculo, sendo que os círculos pretos representam as citosinas metiladas, e os círculos brancos, as citosinas não metiladas. Os traços correspondem aos CpGs indeterminados quanto ao seu perfil de metilação.

5.8 IMUNOPRECIPITAÇÃO DE CROMATINA – ChIP

As modificações de histonas H3K27me3 (cromatina fechada) e H3K4me3 (cromatina aberta) nas linhagens tumorais estão mostrados na Figura 12. Foram comparadas as modificações das histonas das linhagens MCF7 e MDA-MB-436 sem tratamentos com o intuito de avaliar a participação das mesmas na expressão de *MMP2*. Observamos que os níveis de H3 total e H3K27me3 apresentaram-se semelhantes, entretanto, a modificação de histona H3K4me3, que sinaliza para cromatina aberta (expressão gênica), está presente em maiores níveis na linhagem MDA-MB-436.

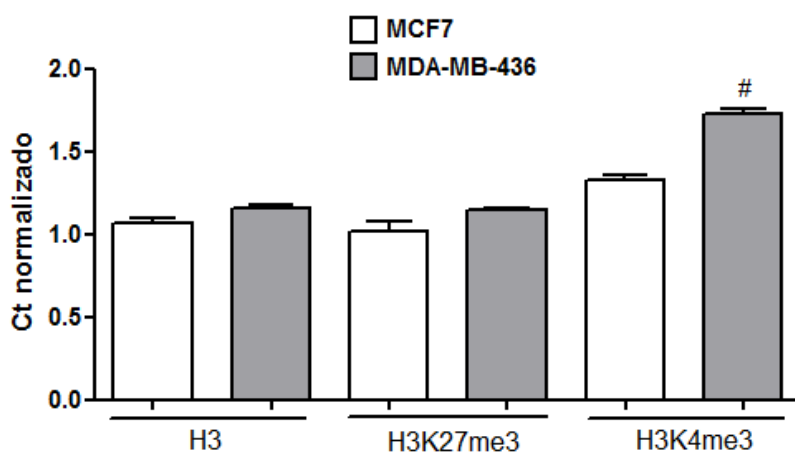


FIGURA 12 – IMUNOPRECIPITAÇÃO DE CROMATINA DAS LINHAGENS MCF7 E MDA-MB-436. Valores de Ct normalizados entre o gene alvo e o gene endógeno (*MMP2/GAPDH*). Em branco estão os valores correspondentes à linhagem MCF7 e, em cinza, os valores correspondentes à linhagem MDA-MB-436, ambas sem tratamento. Em baixo da figura as amostras estão separadas de acordo com o anticorpo utilizado na imunoprecipitação. A análise estatística foi feita com o *t test*. # comparado com MCF7 H3K4me3 ($p < 0,05$).

Além disso, avaliamos essas modificações de histonas após o tratamento com FN por 24h. A linhagem MCF7 manteve os níveis de H3 total e H3K27me3, enquanto a marca H3K4me3 mostrou-se aumentada após o tratamento. Por outro lado, na linhagem MDA-MB-436, os níveis de H3 total, H3K27me3 e H3K4me3 permaneceram semelhantes ao controle não tratado (mock) (Figura 13).

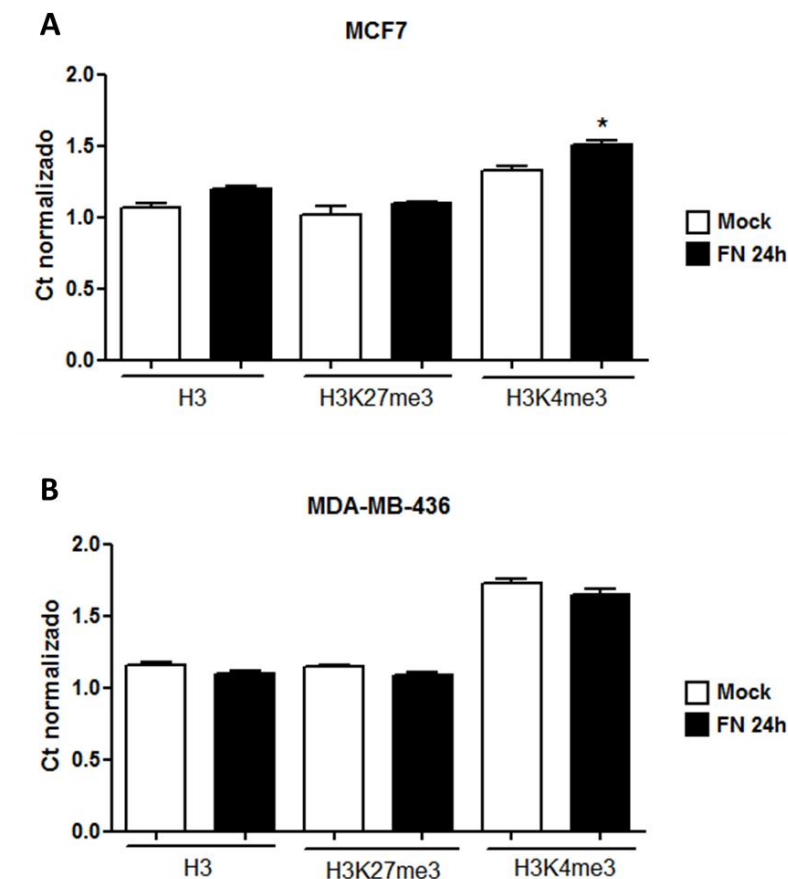


FIGURA 13 – IMUNOPRECIPITAÇÃO DE CROMATINA DAS LINHAGENS MCF7 E MDA-MB-436 TRATADAS COM FIBRONECTINA. (A) Linhagem MCF7; (B) Linhagem MDA-MB-436. Valores de Ct normalizados entre o gene alvo e o gene endógeno (*MMP2/GAPDH*). Em branco estão os valores correspondentes às células sem tratamento ou mock, e em preto estão os valores correspondentes às células tratadas com fibronectina por 24h (FN 24h). Em baixo da figura as amostras estão separadas de acordo com o anticorpo utilizado na imunoprecipitação. A análise estatística foi feita com o *t test*. * comparado com MCF7 mock H3K4me3 ($p < 0,05$).

5.9 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL MIGRATÓRIO DA LINHAGEM TUMORAL MCF7

Sabe-se que a linhagem MCF7 possui uma baixa capacidade invasiva (JOHNSON *et al.*, 1999, TORRICELLI *et al.*, 2006). Diante disso, foram testadas duas metodologias diferentes a fim de se avaliar o potencial migratório da linhagem tumoral após o cultivo com fibronectina. Uma vez que o tratamento com FN por 12 horas apresentou uma expressão relevante de MMP-2, esse grupo foi escolhido para a avaliação do possível envolvimento dessa enzima na capacidade migratória das células.

No ensaio de *wound healing*, as células foram tratadas com FN por 12h e transferidas para poços de uma placa de 24 poços. Após os procedimentos descritos no item 4.6.1, a área da abertura da camada celular foi fotografada e calculada nos tempos 0 e 60 horas, conforme mostrado na Figura 14. Após o tratamento com FN, as células foram capazes de fechar cerca de 50% da área aberta, mostrando um aumento da sua capacidade migratória.

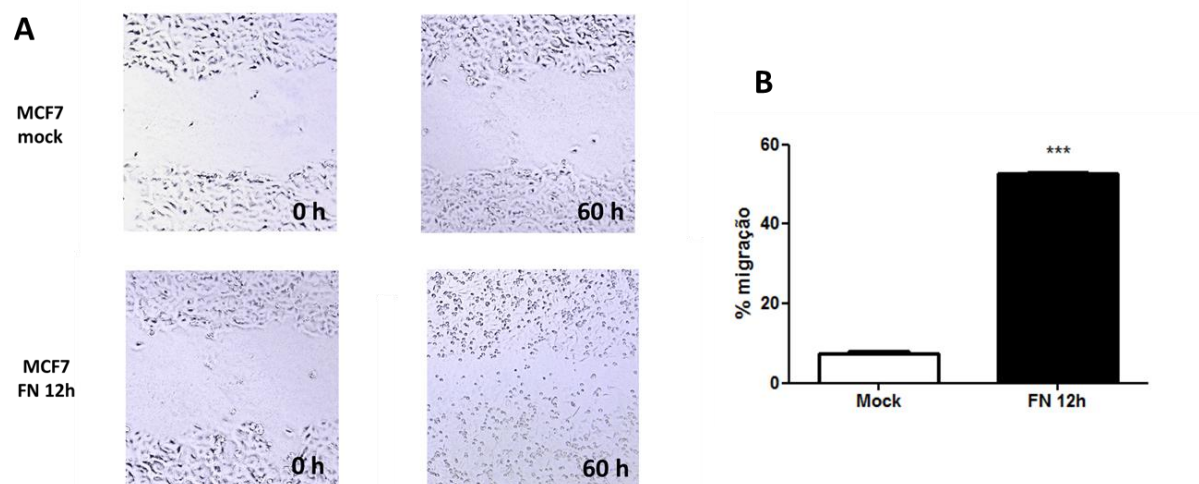


FIGURA 14 - ENSAIO DE *WOUND HEALING* COM A LINHAGEM MCF7. (A) Imagens representativas do controle (mock) e das células tratadas com FN 12h, nos tempos de 0 e 60 horas após a abertura da área, obtidas com microscópio óptico invertido (20x). (B) O gráfico representa a porcentagem (%) de migração (fechamento da área) depois de 60h. A análise estatística foi feita com o *t test*. *** comparado com MCF7 mock ($p < 0,05$).

Por outro lado, no ensaio de migração haptotática, após as células terem sido cultivadas com FN e transferidas para poços de *transwell* contendo colágeno como fator haptotático, não se observou alteração da condição migratória das células de MCF7 (Figura 15).

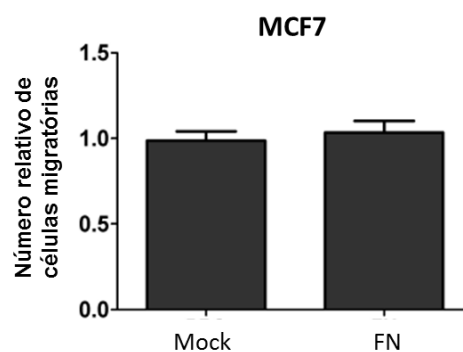


FIGURA 15 – ENSAIO DE MIGRAÇÃO DA LINHAGEM MCF7 TRATADA COM FIBRONECTINA. Mock: MCF7 controle; FN: MCF7 cultivada com fibronectina por 12 h.

6 DISCUSSÃO

As metástases são responsáveis por aproximadamente 90% das mortes decorrentes do câncer de mama (SETHI & KANG, 2011). Uma vez que o processo metastático requer o aumento da motilidade das células tumorais e a destruição da matriz extracelular (MEC) adjacente, a enzima MMP-2 destaca-se nesse contexto pela sua capacidade de clivar componentes da MEC e abrir um caminho para a passagem dessas células. A interação entre as células e a MEC permite uma comunicação bidirecional capaz de modular a expressão gênica através da conexão dos elementos da matriz com os receptores celulares, a matriz nuclear e, então, com a cromatina (BISSELL *et al.*, 1982).

Nesse contexto, a relação entre as metaloproteases e as proteínas que compõem a MEC tem uma importância primordial na progressão de tumores. A fibronectina é uma proteína de matriz que não está presente no tecido normal da mama, mas apresenta-se altamente expressa em tumores mamários (IOACHIM *et al.*, 2002) e está associada à malignidade do tumor e ao prognóstico da doença (HELLEMAN *et al.*, 2008). Além disso, alguns estudos têm demonstrado que a fibronectina é capaz de promover a expressão de MMP-2 em linhagens de mama, tumorais ou normais (DAS *et al.*, 2008; PARK & SCHWARZBAUER, 2013), no entanto o mecanismo pelo qual isso acontece ainda precisa ser esclarecido.

O gene *MMP2*, que codifica para a enzima MMP-2, é regulado por mudanças epigenéticas, como a metilação do DNA (CHERNOV *et al.*, 2009; CHIK & SZYF, 2011), e pode ser ativado ou silenciado durante o processo metastático (STAMENKOVIC, 2000). Como apresentado no artigo do Capítulo I, nosso grupo de pesquisa observou o efeito da fibronectina na regulação epigenética do gene *MMP2*. Após 5 horas de tratamento com a fibronectina, a linhagem MCF7 passou a expressar o gene *MMP2*, que teve seu promotor desmetilado em 30%. Entretanto, esse processo foi transitório, uma vez que houve a remetilação parcial do promotor após a retirada da fibronectina do cultivo celular (PEREIRA *et al.*, 2014).

Diante desses resultados, nos questionamos a respeito desse efeito transitório observado, e foi decidido testar a hipótese de que um tempo prolongado de exposição à fibronectina poderia promover uma maior desmetilação do promotor de *MMP2*, assim como estabilizar essa modificação. Portanto, a fim de confirmar e complementar o estudo sobre o efeito da fibronectina no perfil de metilação do

promotor do gene *MMP2*, células das linhagens MCF7 e MDA-MB-436 foram cultivadas na ausência de SFB e submetidas ao tratamento com fibronectina por tempos maiores do que os já testados.

A linhagem MCF7 não expressa o gene *MMP2* e seu promotor se apresenta densamente metilado (metilação global de 90%) (Figura 10). O cultivo com a FN por 8, 12 e 24 horas possibilitou a expressão do gene *MMP2* (Figuras 6) e da enzima MMP-2 em sua forma ativa (dados não mostrados). Após esses tratamentos, observou-se uma desmetilação parcial do promotor do gene *MMP2* (Figura 10), confirmando o efeito da FN que acarretou na expressão desse gene e corroborando com os dados anteriores do nosso grupo. Os tempos prolongados de exposição à FN induziram maior desmetilação nos tempos de 12 e 24 horas (50% e 38%, respectivamente) quando comparadas à observada após 5 horas (30%). Entretanto, as células recultivadas na ausência de FN continuaram apresentando um aumento na metilação do promotor, quando comparadas com as células logo após o tratamento (Figura 10), reafirmando o efeito transitório proporcionado por essa proteína nos mecanismos intracelulares. Esses dados nos levam a concluir que um maior tempo de tratamento com FN pode levar a uma maior desmetilação do promotor, porém esse processo não permanece estável.

Da mesma maneira, a linhagem MDA-MB-436 que expressa baixos níveis de *MMP2* na condição livre de SFB, após o cultivo com a FN por 24 horas teve a expressão do gene *MMP2* aumentada significativamente quando comparada com as células não tratadas (Figura 7). A metilação global do promotor do gene *MMP2* também reduziu após o tratamento (Figura 11), apresentando-se menor do que comparada com o tratamento por 5 horas (52% de metilação global), e evidenciando uma maior desmetilação induzida por um tempo prolongado de tratamento. Esses dados descartam a possibilidade de que o efeito da FN sobre o promotor de *MMP2* seja específico da linhagem MCF7.

Estes resultados de desmetilação do promotor do gene *MMP2* depois do cultivo com FN podem representar um importante passo durante a metástase. Os eventos epigenéticos parecem ser mecanismos chave para o processo metastático (TAM & WEINBERG, 2013) e o gene *MMP2* mostrou-se passível de ser ativado através da desmetilação do seu promotor induzida pela sinalização da FN, conforme já mostrado no artigo do Capítulo I.

Além disso, Ramos (2013) em sua tese de doutorado discute a participação de CpGs específicos que poderiam constituir prováveis locais de ligação de fatores de transcrição importantes no controle da expressão de *MMP2*. Em sua análise, verificou que sobre os CpGs 33 a 37 existem sítios de ligação para um grupo de proteínas denominadas de PRDM, as quais desempenham um papel importante na regulação da expressão gênica, modificando a estrutura da cromatina através da atividade metiltransferase ou através do recrutamento de complexos de remodelação da cromatina (DI ZAZZO *et al.*, 2013). Nos resultados do presente trabalho, podemos observar que esses mesmos CpGs específicos encontram-se preferencialmente desmetilados após os tratamentos, e principalmente, permanecem desmetilados no recultivo da linhagem MCF7 (Figura 10). Esse fato pode sugerir um importante papel de regulação desses CpGs, inclusive na manutenção da expressão gênica no recultivo (Figura 6). Contudo, ensaios adicionais seriam necessários para verificar a efetiva ligação de tais complexos à sequência promotora do gene *MMP2*, e confirmar a participação desses CpGs.

Analisando os resultados do perfil de metilação do promotor após o tratamento com FN, também é possível observar a manutenção da metilação dos CpGs 28, 29 e 31, mesmo quando a sequência de um determinado clone apresenta-se quase que integralmente desmetilada (Figura 10 e 11). Esse padrão pode indicar uma participação desses CpGs na manutenção do estado de metilação do promotor, uma vez que este é remetilado após a retirada da FN do cultivo celular. Desta maneira, a estabilidade da metilação nesses CpGs específicos funcionaria como uma etiqueta molecular para sinalizar a necessidade de remetilação do promotor pela maquinaria enzimática envolvida.

Ainda, a FN após 5 horas foi capaz de induzir o início da modificação em uma marca de histona no promotor de *MMP2* que sinaliza para a ativação da transcrição gênica (RAMOS, 2013; PEREIRA *et al.*, 2014). Portanto, as modificações de histonas associadas ao promotor de *MMP2* também foram avaliadas através da técnica de imunoprecipitação de cromatina após os tratamentos com FN por 24 horas, nas linhagens MCF7 e MDA-MB-436. A H3K27me3 é associada à repressão transcricional de genes e à compactação da cromatina (ROSE & KLOSE, 2014). Foi possível observar que essa marca aparece em níveis parecidos entre as linhagens MCF7 e MDA-MB-436 e esses níveis foram mantidos após os tratamentos com FN (Figuras 12 e 13).

Por outro lado, a H3K4me3, que é associada a promotores ativos, mostrou-se significativamente maior na linhagem MDA-MB-436 do que na linhagem MCF7 (Figura 12). Este dado pode explicar a expressão de *MMP2*, mesmo que em baixos níveis, da linhagem MDA-MB-436, enquanto essa expressão é negativa na linhagem MCF7. Além disso, a H3K4me3 não se altera após o tratamento com FN na linhagem MDA-MB-436, possivelmente demonstrando que esta linhagem já possuía um estado de cromatina mais aberto do que a linhagem MCF7 (Figura 13B).

Na linhagem MCF7, a H3K4me3 teve seus níveis aumentados após o tratamento com FN por 24h, indicando uma possível abertura da cromatina na região estudada (Figura 13A) e confirmando o efeito que já havia sido observado após 5 horas de tratamento. Chernov e colaboradores (2009), ainda, mostraram que a linhagem MCF7 possui elevados níveis de H3K4me2 na região promotora do gene *MMP2* e esta característica seria importante para a rápida ativação da transcrição do gene (CHERNOV *et al.*, 2009).

Outro trabalho descreveu o aumento da marca H3K4me3 no promotor do gene da metaloprotease MMP-9 como importante regulador da sua expressão, colaborando na progressão tumoral (COCK-RADA *et al.*, 2012). Além disso, já se tem descrito na literatura a associação entre a metilação do DNA e as modificações das histonas. Por exemplo, ilhas de CpG não-metiladas funcionam como marcas primárias para a deposição de H3K4me3, uma vez que interagem com a proteína Cfp1 (*CXXC finger protein 1*), componente do complexo da H3K4 metiltransferase Setd1 (THOMSON *et al.*, 2010). Esse fato sugere uma relação entre a desmetilação observada no promotor e o aumento da marca H3K4me3 no gene *MMP2* na linhagem MCF7.

A manutenção da H3K27me3 e o aumento da H3K4me3 após o tratamento com fibronectina na linhagem MCF7 assemelham-se a um padrão conhecido como “domínios bivalentes”, os quais estão presentes nos promotores de células embrionárias e se caracterizam pela presença concomitante de marcas de repressão (H3K27me) e ativação (H3K4me3) nas histonas (KOUZARIDES, 2007). Essas marcas são responsáveis pelo equilíbrio da expressão gênica, permitindo a ativação e repressão oportunas (CEDAR & BERGMAN, 2009; VOIGT *et al.*, 2013). Ainda, há indícios de que quando genes hipermetilados são desmetilados e reexpressos em células de câncer de cólon, eles adotam um estado bivalente de cromatina (MCGARVEY *et al.*, 2008). Esse fato já foi discutido no artigo do Capítulo I, e os resultados complementares que apresentamos acima reforçam a teoria de que a

desmetilação e a expressão do gene *MMP2* induzidas pela FN podem ter sido acompanhadas pela manutenção destas marcas bivalentes no promotor do gene. Além do que, a presença desses domínios pode estar influenciando na manutenção da metilação do promotor do gene, uma vez que a presença da H3K27me3 parece sinalizar para o silenciamento gênico quando o sinal de ativação não estiver presente (MCGARVEY *et al.*, 2006), levando a remetilação observada nas células recultivadas após os tratamentos.

A comunicação entre as diferentes modificações da cromatina, como a metilação do DNA e as marcas de histonas, fornece um reforço ao estado epigenético. A ação combinada dessa rede de informação da cromatina leva a manutenção do estado de metilação do DNA de regiões específicas, através do direcionamento de DNMTs ou de “desmetilases”, como a TET, para esses sítios, ou então pela associação de proteínas de ligação ao DNA que protegem CpGs individuais da metilação e/ou desmetilação (JELTSCH & JURKOWSKA, 2014). Essas informações reforçam a possibilidade de que a manutenção da metilação dos CpGs 28, 29 e 31 e a presença da H3K27me3 no promotor do gene *MMP2* após os tratamentos com FN parecem sinalizar para o silenciamento gênico, levando a remetilação do promotor nas células recultivadas.

Também foi avaliado o potencial migratório das células da linhagem MCF7 após o tratamento com FN por 12h. Depois do tratamento e o consequente aumento da expressão de *MMP2*, as células foram capazes de fechar parcialmente a área aberta da camada celular no ensaio de *wound healing*, evidenciando um aumento da capacidade migratória (Figura 14), assim como o observado após o cultivo por 5h (PEREIRA *et al.*, 2014). Esses dados corroboram com a literatura, que descreve a participação da expressão de *MMP2* na motilidade e invasividade de células tumorais de mama (MAGEE *et al.*, 2014; NI *et al.*, 2014) e confirmam nossos dados anteriores. Por outro lado, no ensaio de migração haptotática, as células tratadas com FN por 12h não apresentaram alteração na capacidade migratória (Figura 15), assim como após 5h de tratamento. Nós esperávamos que a exposição prolongada à FN poderia levar ao aumento da migração da MCF7 neste ensaio, uma vez que a expressão de *MMP2* apresentou-se superior do que a do tratamento por 5 horas. Entretanto isso não foi observado, possivelmente pelo tipo de preparação desta metodologia. Ao contrário do ensaio de *wound healing*, a migração haptotática requer o preparo de uma suspensão

celular que rompe as interações célula-célula e célula-substrato, importantes para o processo de migração (LIANG *et al.*, 2007).

A interação entre as células e a FN inicialmente é mediada pelo contato com o receptor de integrina $\alpha 5\beta 1$, que interage com a região central da fibronectina (AKIYAMA *et al.*, 1995). Sinais originados através de integrinas e seus ligantes podem controlar mecanismos na progressão tumoral, como invasão celular e expressão gênica (GOEL *et al.*, 2008). Já é descrito que, em linhagens de mama, a ligação entre a FN e as subunidades de integrinas $\alpha 5\beta 1$ na superfície celular é responsável pela expressão do gene *MMP2* (DAS *et al.*, 2008). Ainda, outros trabalhos têm demonstrado a participação da sinalização de integrinas na ativação epigenética de determinados genes em processos de TEM (MARGADANT *et al.*, 2012) e de invasão células de câncer de mama (CHEN *et al.*, 2009).

Portanto, a FN seria um fator presente no microambiente tumoral capaz de sinalizar à célula o processo de ativação possivelmente pela via de integrinas, contribuindo para a desmetilação da região promotora de *MMP2* e consequente expressão do gene. Dessa forma, a sinalização de fibronectina parece induzir a ativação de um importante gene associado às metástases tumorais, corroborando com os resultados anteriores do nosso grupo, e reforçando o efeito transitório sobre as modificações epigenéticas. Um tempo prolongado de exposição à fibronectina induziu nas células tumorais de mama uma expressão significativa do gene *MMP2* e uma maior desmetilação do seu promotor, entretanto, essa resposta continua sendo revertida parcialmente após a retirada do estímulo.

7 CONCLUSÃO

A fibronectina, proteína presente na matriz extracelular, foi capaz de regular epigeneticamente a expressão do gene *MMP2* nas linhagens tumorais de mama MCF7 e MDA-MB-436. Após o tratamento por 8, 12 e 24 horas da linhagem MCF7 e 24 horas da linhagem MDA-MB-436, as células tiveram a expressão do gene aumentada e apresentaram a região promotora desmetilada. Além disso, houveram mudanças nas marcas de histonas e no fenótipo celular da linhagem MCF7, que teve seu potencial migratório aumentado. As modificações observadas após o cultivo com fibronectina mostraram-se transitórias, pois, uma vez que o estímulo (FN) foi retirado essas modificações não permaneceram estabilizadas. Esses dados confirmam os resultados já observados pelo nosso grupo e complementam o estudo sobre a regulação epigenética do gene *MMP2*.

REFERÊNCIAS

- ANTEQUERA, F. Structure, function and evolution of CpG island promoters. **Cell Mol Life Sci**, v.60, n.8, p.1647-58, 2003.
- ARTACHO-CORDÓN, F.; RÍOS-ARRABAL, S.; LARA, P. C.; *et al.* Matrix metalloproteinases: Potential therapy to prevent the development of second malignancies after breast radiotherapy. **Surgical oncology**, p. 1–9, 2012.
- Akiyama, S. K., K. Olden, *et al.* Fibronectin and integrins in invasion and metastasis. **Cancer Metastasis Rev**, v.14, n.3, Sep, p.173-89. 1995
- AUCLAIR, G.; WEBER, M. Mechanisms of DNA methylation and demethylation in mammals. **Biochimie**, p. 1–10, 2012.
- AZNAVOORIAN, S., M. L. STRACKE, *et al.* Signal transduction for chemotaxis and haptotaxis by matrix molecules in tumor cells. **J Cell Biol**, v.110, n.4, p.1427-38, 1990.
- BARTEL, D. P.; LEE, R.; FEINBAUM, R. MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function Genomics: The miRNA Genes. **Cell**, v. 116, p. 281–297, 2004.
- BAUVOIS, B. New facets of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 as cell surface transducers: outside-in signaling and relationship to tumor progression. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1825, n. 1, p. 29–36, 2012.
- BERNARDO, M. M.; FRIDMAN, R. TIMP-2 (tissue inhibitor of metalloproteinase-2) regulates MMP-2 (matrix metalloproteinase-2) activity in the extracellular environment after pro-MMP-2 activation by MT1 (membrane type 1) -MMP. **Biochem J**, v. 745, p. 739–745, 2003.
- BERNSTEIN, B. E.; MEISSNER, A.; LANDER, E. S. The mammalian epigenome. **Cell**, v. 128, n. 4, p. 669–81, 2007.
- BESTOR, T. H. The DNA methyltransferases of mammals. **Human molecular genetics**, v. 9, n. 16, p. 2395–2402, 2000.
- BIRD, A. Perceptions of epigenetics. **Nature**, v. 447, n. 7143, p. 396–8, 2007.
- BISSELL, M. J.; HALL, H. G.; PARRY, G. How does the extracellular matrix direct gene expression? **Journal of theoretical biology**, v. 99, n. 1, p. 31–68, 1982.
- BOMBONATI, A.; SGROI, D. C. The molecular pathology of breast cancer progression. **The Journal of pathology**, v. 223, n. 2, p. 307–17, 2011.
- CEDAR, H.; BERGMAN, Y. Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms. **Nature Reviews Genetics**, v. 10, p. 295–304, 2009.
- CHEN, M.; SINHA, M.; LUXON, B. A.; BRESNICK, A. R.; O'CONNOR, K. L. Integrin $\alpha 6 \beta 4$ Controls the Expression of Genes Associated with Cell Motility, Invasion,

and Metastasis , Including S100A4/Metastasin. **The Journal of biological chemistry**, v. 284, p. 1484–1494, 2009.

CHERNOV, A. V.; SOUNNI, N. E.; REMACLE, A. G.; STRONGIN, A. Y. Epigenetic control of the invasion-promoting MT1-MMP/MMP-2/TIMP-2 axis in cancer cells. **The Journal of biological chemistry**, v. 284, n. 19, p. 12727–34, 2009.

CHERNOV, A. V.; STRONGIN, A. Y. Epigenetic regulation of matrix metalloproteinases and their collagen substrates in cancer. **Biomol Concepts** , v. 2, n. 3, p. 135–147, 2011.

CHIK, F.; SZYF, M. Effects of specific DNMT gene depletion on cancer cell transformation and breast cancer cell invasion; toward selective DNMT inhibitors. **Carcinogenesis**, v. 32, n. 2, p. 224–32, 2011.

COCK-RADA, A. M.; MEDJKANE, S.; JANSKI, N. SMYD3 Promotes Cancer Invasion by Epigenetic Upregulation of the Metalloproteinase MMP-9. **Cancer research**, v. 72, p. 810–820, 2012.

CONNOLLY, R.; STEARNS, V. Epigenetics as a Therapeutic Target in Breast Cancer. **Journal of mammary gland biology and neoplasia**, 2012.

COSTA, F.F.; PAIXAO, V.A.; CAVALHER, F.P.; RIBEIRO, K.B.; CUNHA, I.W.; RINCK, J.A.; O'HARE, M.; MACKAY, A.; SOARES, F.A.; BRENTANI, R.R. SATR-1 hypomethylation is a common and early event in breast cancer. **Cancer Genet Cytogenet**, v.165, n.2, p.135-143, 2006.

DAS, S.; BANERJI, A.; FREI, E.; CHATTERJEE, A. Rapid expression and activation of MMP-2 and MMP-9 upon exposure of human breast cancer cells (MCF-7) to fibronectin in serum free medium. **Life sciences**, v. 82, n. 9-10, p. 467–76, 2008.

DAVIDSON, B.; TROPE, C. G.; REICH, R. The role of the tumor stroma in ovarian cancer. **Frontiers in oncology**, v. 4, n. May, p. 1–11, 2014.

DAWSON, M. A.; KOUZARIDES, T. Cancer Epigenetics: From Mechanism to Therapy. **Cell**, v. 150, n. 1, p. 12–27, 2012.

DI ZAZZO, E.; ROSA, C. DE; ABBONDANZA, C.; MONCHARMONT, B. PRDM Proteins: Molecular Mechanisms in Signal Transduction and Transcriptional Regulation. **Biology**, v. 2, n. 1, p. 107–41, 2013.

FEINBERG, A. P. e TYCKO, B. The history of cancer epigenetics. **Nat Rev Cancer**, v.4, n.2, p.143-53, 2004.

FENG, Y.; SUN, B.; LI, X.; *et al.* Differentially expressed genes between primary cancer and paired lymph node metastases predict clinical outcome of node-positive breast cancer patients. **Breast Cancer Res Treat**, p. 319–329, 2007.

FERLAY, J.; SHIN, H.-R.; BRAY, F.; *et al.* Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. **International journal of cancer**, v. 127, n. 12, p. 2893–917, 2010.

FERLAY J, SOERJOMATARAM I, ERVIK M, DIKSHIT R, ESER S, MATHERS C, REBELO M, PARKIN DM, FORMAN D, BRAY, F. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC Cancer Base No. 11. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013. Disponível em: <http://globocan.iarc.fr>, accessed on day/month/year.

GARCÍA-GIMÉNEZ, J. L.; SANCHIS-GOMAR, F.; LIPPI, G.; *et al.* Epigenetic biomarkers: A new perspective in laboratory diagnostics. **Clinica Chimica Acta**, 2012.

GEZER, U.; HOLDENRIEDER, S. Post-translational Histone Modifications in Circulating Nucleosomes as New Biomarkers in Colorectal Cancer. **in vivo**, v. 28, p. 287–292, 2014.

GOEL, H. L.; LI, J.; KOGAN, S.; LANGUINO, L. R. Integrins in prostate cancer progression. **Endocrine-related cancer**, v. 15, n. 3, p. 657–664, 2008.

GOUBRAN, H. A.; KOTB, R. R.; STAKIW, J.; EMARA, M. E.; BURNOUF, T. Regulation of Tumor Growth and Metastasis: The Role of Tumor Microenvironment. **Cancer Growth and Metastasis**, p. 9–18, 2014.

GROBLEWSKA, M.; SIEWKO, M.; MROCZKO, B.; SZMITKOWSKI, M. The role of matrix metalloproteinases (MMPs) and their inhibitors (TIMPs) in the development of esophageal cancer. **Folia histochemica et cytobiologica**, v. 50, n. 1, p. 12–9, 2012.

GRONBAEK, K.; HOTHER, C.; JONES, P. A. Epigenetic changes in cancer. **APMIS**, v. 115, p. 1039–1059, 2007.

HABERLAND, M.; MONTGOMERY, R. L.; OLSON, E. N. The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy. **Nature Reviews Genetics**, v. 10, p. 32-42, 2009.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A.. The hallmarks of cancer. **Cell**, v.100, n.1, p.57-70, 2000.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–74, 2011.

HELLEMAN, J.; JANSEN, M. P. H. M.; RUIGROK-RITSTIER, K.; *et al.* Association of an extracellular matrix gene cluster with breast cancer prognosis and endocrine therapy response. **Clinical Cancer Research**, v. 14, n. 17, p. 5555–64, 2008.

INCA. Estimativas 2014: Incidência de câncer no brasil. **Instituto Nacional do Câncer**. Disponível em: <http://www.inca.gov.br>. Rio de Janeiro 2013.

IOACHIM, E.; CHARCHANTI, A.; BRIASOULIS, E.; KARAVASILIS, V.; TSANOU, H. Immunohistochemical expression of extracellular matrix components tenascin , fibronectin , collagen type IV and laminin in breast cancer : their prognostic value and role in tumour invasion and progression. **European Journal of Cancer**, v. 38, p. 2362–2370, 2002.

JELTSCH, A.; JURKOWSKA, R. Z. New concepts in DNA methylation. **Trends in biochemical sciences**, v. 39, n. 7, p. 310–318, 2014.

JEMAL, A.; BRAY, F.; FERLAY, J. Global Cancer Statistics. **CA Cancer Journal**, v. 61, n. 2, p. 69–90, 2011.

JEZIERSKA, A.; MOTYL, T. Matrix Metalloproteinase-2 involvement in breast cancer progression: A mini-review. **Med Sci Monit**, v. 15, n. 2, 2009.

JOHNSON, M. D., TORRI, J. A., *et al.* Regulation of motility and protease expression in PKC-mediated induction of MCF7 breast cancer cell invasiveness. **Exp Cell Res**, v. 247, n. 1, p. 105-13, 1999.

JONES, P. A; BAYLIN, S. B. The fundamental role of epigenetic events in cancer. **Nature reviews Genetics**, v. 3, n. 6, p. 415–28, 2002.

KALLURI, R. e ZEISBERG, M. Fibroblasts in cancer. **Nat Rev Cancer**, v.6, n.5, p.392-401, 2006.

KASPAR, M.; ZARDI, L.; NERI, D. Fibronectin as target for tumor therapy. **International journal of cancer. Journal international du cancer**, v. 118, n. 6, p. 1331–9, 2006.

KENNY, H. A.; KAUR, S.; COUSSENS, L. M.; LENGYEL, E. The initial steps of ovarian cancer cell metastasis are mediated by MMP-2 cleavage of vitronectin and fibronectin. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 118, n. 4, p. 1367–1379, 2008.

KESSENBROCK, K.; PLAKS, V.; WERB, Z. Matrix Metalloproteinases: Regulators of the Tumor Microenvironment. **Cell**, v. 141, n. 1, p. 52–67, 2011.

KÖHRMANN, A.; KAMMERER, U.; KAPP, M.; DIETL, J.; ANACKER, J. Expression of matrix metalloproteinases (MMPs) in primary human breast cancer and breast cancer cell lines: New findings and review of the literature. **BMC cancer**, v. 9, p. 188, 2009.

KOUZARIDES, T. Chromatin modifications and their function. **Cell**, v. 128, n. 4, p. 693–705, 2007.

LANGENSKIÖLD, M.; HOLMDAHL, L.; FALK, P.; IVARSSON, M.-L. Increased plasma MMP-2 protein expression in lymph node-positive patients with colorectal cancer. **International journal of colorectal disease**, v. 20, n. 3, p. 245–52, 2005.

LELIÈVRE, S. A. Contributions of extracellular matrix signaling and tissue architecture to nuclear mechanisms and spatial organization of gene expression control. **BBA - General Subjects**, v. 1790, n. 9, p. 925–935, 2009.

LI, H. C.; CAO, D. C.; LIU, Y.; *et al.* Prognostic value of matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) in patients with lymph node-negative breast carcinoma. **Breast cancer research and treatment**, v. 88, n. 1, p. 75–85, 2004.

LIANG, C.; PARK, A. Y.; GUAN, J. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. **Nature Protocols**, v. 2, n. 2, p. 329–333, 2007.

LIU, S.; YANG, S.; YEH, K.; YEH, C.; CHIOU, H. Relationships between the level of matrix metalloproteinase-2 and tumor size of breast cancer. **Clinica Chimica Acta**, v. 371, p. 92–96, 2006.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2-ddCT Method. **Methods**, v. 25, p. 402–408, 2001.

MAGEE, P. J.; ALLSOPP, P.; SAMALETDIN, A.; ROWLAND, I. R. Daidzein, R- (+) equol and S-(2) equol inhibit the invasion of MDA-MB-231 breast cancer cells potentially via the down-regulation of matrix metalloproteinase-2. **European Journal of Nutrition**, v. 53, p. 345–350, 2014.

MARGADANT, C.; BOUT, I. VAN DEN; BOXTEL, A. L. VAN; THIJSSSEN, V. L. Epigenetic Regulation of Galectin-3 Expression by beta1 Integrins Promotes Cell Adhesion and Migration. **The Journal of biological chemistry**, v. 287, p. 44684–44693, 2012.

MCGARVEY, K. M.; FAHRNER, J. A.; GREENE, E.; *et al.* Silenced tumor suppressor genes reactivated by DNA demethylation do not return to a fully euchromatic chromatin state. **Cancer research**, v. 66, n. 7, p. 3541–9, 2006.

MCGARVEY, K. M.; NESTE, L. VAN; COPE, L.; *et al.* Defining a chromatin pattern that characterizes DNA-hypermethylated genes in colon cancer cells. **Cancer research**, v. 68, n. 14, p. 5753–9, 2008.

MCPHERSON, K.; STEEL, C. M.; DIXON, J. M. Breast cancer — epidemiology, risk factors, and genetics risk factors for breast cancer. **ABC of Breast Diseases**, v. 321, p. 624–628, 2000.

MIN, K.; KIM, D.; DO, S.; *et al.* Expression patterns of stromal MMP-2 and tumoural MMP-2 and -9 are significant prognostic factors in invasive ductal carcinoma of the breast. **APMIS**, v. 2, n. 5, p. 1–11, 2014.

MOHAMMAD, M. A.; ZEENELDIN, A. A.; ABD ELMAGEED, Z. Y.; *et al.* Clinical relevance of cyclooxygenase-2 and matrix metalloproteinases (MMP-2 and MT1-MMP) in human breast cancer tissue. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 366, n. 1-2, p. 269–75, 2012.

MOMPARLER, R. L. Cancer epigenetics. **Oncogene**, v.22, n.42, p.6479-83, 2003.
NI, X.; XIA, T.; ZHAO, Y.; *et al.* Downregulation of miR-106b induced breast cancer cell invasion and motility in association with overexpression of matrix metalloproteinase 2. **Cancer Science**, v. 105, p. 18–25, 2014.

NOWSHEEN, S.; AZIZ, K.; TRAN, P. T.; *et al.* Epigenetic inactivation of DNA repair in breast cancer. **Cancer letters**, p. 1–10, 2012.

PARK, M. T. e LEE, S. J. Cell cycle and cancer. **J Biochem Mol Biol**, v.36, n.1, p.60-5, 2003.

PARK, J.; SCHWARZBAUER, J. E. Mammary epithelial cell interactions with fibronectin stimulate epithelial-mesenchymal transition. **Oncogene**, 2013.

PARTYKA, R. GONCIARZ, M.; JALOWIECKI, P.; KOKOCINSKA, D.; BYRCZEK, T. VEGF and metalloproteinase 2 (MMP2) expression in gastric cancer tissue. **Med Sci Monit**, v. 18, n. 4, p. 130-134, 2012.

PEREIRA, I. T.; RAMOS, E. A S.; COSTA, E. T.; *et al.* Fibronectin Affects Transient *MMP2* Gene Expression through DNA Demethylation Changes in Non-Invasive Breast Cancer Cell Lines. **PloS one**, v. 9, n. 9, 2014.

POLYAK, K. Breast cancer: origins and evolution. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 117, n. 11, 2007.

QUARANTA, M.; DANIELE, A.; COVIELLO, M.; VENNARI, M.T.; ABBATE, I.; CARINGELLA, M.E. MMP-2, MMP-9, VEGF and CA 15.3 in breast cancer. **Anticancer research**, v. 27, p. 3593-3600, 2007.

RAMOS, E. A. S. **Perfil epigenético dos genes *CXCR4*, *CXCL12*, *ESR1*, *PGR* e *MMP2* envolvidos com o mecanismo molecular de metástase em câncer de mama**. Tese (Doutorado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia) – Departamento de Patologia Básica, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

ROBERTS, L.M.; VISSER, J.A.; INGRAHAM, H. A. Involvement of a matrix metalloproteinase in MIS-induced cell death during urogenital development. **Development**, n. 129, p. 1487-1496, 2002.

ROSE, N. R.; KLOSE, R. J. Understanding the relationship between DNA methylation and histone lysine methylation. **Biochimica et Biophysica Acta**, 2014.

RUDNICK, J. A; KUPERWASSER, C. Stromal biomarkers in breast cancer development and progression. **Clinical & experimental metastasis**, v. 2., 2012.

SAAD, S.; GOTTLIEB, D. J.; BRADSTOCK, K. F.; OVERALL, C. M.; BENDALL, L. J. Cancer Cell-associated Fibronectin Induces Release of Matrix Metalloproteinase-2 from Normal Fibroblasts Cancer Cell-associated Fibronectin Induces Release of Matrix Metalloproteinase-2. **Cancer Research**, p. 283–289, 2002.

SBARDELLA, D.; FASCIGLIONE, G. F.; GIOIA, M.; *et al.* Human matrix metalloproteinases: an ubiquitous class of enzymes involved in several pathological processes. **Molecular aspects of medicine**, v. 33, n. 2, p. 119–208, 2012.

SCHOMACHER, L. Mammalian DNA demethylation: Multiple faces and upstream regulation. **Epigenetics**, v. 8, n. 7, p. 679–684, 2013.

SETHI, N.; KANG, Y. Unravelling the complexity of metastasis — molecular understanding and targeted therapies. **Nature Reviews Cancer**, v. 11, p. 735–748, 2011.

SHAH, F. D.; SHUKLA, S. N.; SHAH, P.; SHUKLA, H. K.; PATEL, P. S. Clinical significance of matrix metalloproteinase 2 and 9 in breast cancer. **Indian Journal of Cancer**, v. 46, n. 3, p. 194–202, 2009.

SHUKEIR, N., P. PAKNESHAN, et al. Alteration of the methylation status of tumor-promoting genes decreases prostate cancer cell invasiveness and tumorigenesis in vitro and in vivo. **Cancer Res**, v.66, n.18, p.9202-10, 2006.

SCHMITT, F.; GOBBI, H. Mama. In: BRASILEIRO-FILHO, G. et al. (Ed.). **Bogliolo: patologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p. 613-643.

SIEGEL, R.; MA, J.; ZOU, Z.; JEMAL, A. Cancer Statistics , 2014. **CA Cancer Journal Clinical**, v. 64, n. 1, p. 9–29, 2014.

SORLIE, T. Molecular portraits of breast cancer: tumour subtypes as distinct disease entities. **European journal of cancer**, v. 40, n. 18, p. 2667–75, 2004.

STAMENKOVIC, I. Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. **Semin Cancer Biol**, v.10, n.6, p.415-33, 2000.

STEFFENSEN, B.; XU, X.; MARTIN, P. A; ZARDENETA, G. Human fibronectin and MMP-2 collagen binding domains compete for collagen binding sites and modify cellular activation of MMP-2. **Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology**, v. 21, n. 5, p. 399–414, 2002.

TALVENSAARI-MATTILA, A.; PAAKKO, P.; TURPEENNIEMI-HUJANEN, T. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) is associated with survival in breast carcinoma. **British journal of cancer**, v. 89, p.1270-1275, 2003.

TAM, W. L.; WEINBERG, R. A. The epigenetics of epithelial-mesenchymal plasticity in cancer. **Nature Medicine**, v. 19, n. 11, p. 1438–1449, 2013.

THOMSON, J. P.; SKENE, P. J.; SELFRIDGE, J.; et al. CpG islands influence chromatin structure via the CpG-binding protein Cfp1. **Nature Letters**, v. 464, p. 1082–1087, 2010.

TORRICELLI, C., FORTINO V., et al. Role of PHTrp and PTHrp-engaged pathways in MCF7 cells migration/invasion. **Matrix Biol**, v. 25, n. 2, p. 104-11, 2006.

TRICHOPOULOS, D.; ADAMI, H.-O.; EKBOM, A.; HSIEH, C.-C.; LAGIOU, P. Early life events and conditions and breast cancer risk: from epidemiology to etiology. **International journal of cancer**, v. 122, n. 3, p. 481–5, 2008.

VOIGT, P.; TEE, W.; REINBERG, D. A double take on bivalent promoters A double take on bivalent promoters. **Genes & development**, v. 27, p. 1318–1338, 2013.

WEIGELT, B.; PETERSE, J. L.; 'T VEER, L. J. VAN. Breast cancer metastasis: markers and models. **Nature reviews Cancer**, v. 5, n. 8, p. 591–602, 2005.

WILLIAMS, K.; CHRISTENSEN, J.; HELIN, K. DNA methylation: TET proteins-guardians of CpG islands? **EMBO reports**, v. 13, n. 1, p. 28–35, 2012.

WU, H.; ZHANG, Y. Mechanisms and functions of Tet protein-mediated 5-methylcytosine oxidation. **Genes & development**, v. 25, n. 23, p. 2436–52, 2011.

ANEXOS

ANEXO I

- PARES DE INICIADORES E CONDIÇÕES DAS REAÇÕES UTILIZADOS NA REAÇÃO PCR PARA AMPLIFICAÇÃO DE *GAPDH*.

Par de iniciadores	Condições
Universal 5' CTGCACCACCAACTGCTTA 3'	95 °C – 5'
	94 °C – 30''
	62 °C – 45''
Reverso 5' CATGACGGCAGGTCAGGTC 3'	72 °C – 45''
	72 °C – 5'
	35 X

- PARES DE INICIADORES E CONDIÇÕES DAS REAÇÕES UTILIZADOS NA REAÇÃO RT-PCR PARA AMPLIFICAÇÃO DE *MMP2*.

Par de iniciadores	Condições
Universal 5' TACACCTACACCAAGAACTTC 3'	95 °C – 5'
	94 °C – 30''
	50 °C – 30''
Reverso 5' GTCCTTGAAGAAGATCTC 3'	72 °C – 30''
	72 °C – 5'
	35 X

- PARES DE INICIADORES UTILIZADOS NA REAÇÃO DE qRT-PCR .

	Par de iniciadores	Tamanho do fragmento
<i>HPRT</i>	Universal 5' GAACGTCTTGCTCGAGATGTGA 3'	101 pb
	Reverso 5' TCCAGCAGGTCAGCAAAGAAT 3'	
<i>MMP2</i>	Universal 5' AGCTCCCGGAAAAGATTGATG 3'	101 pb
	Reverso 5' CAGGGTGCTGGCTGAGTAGAT 3'	

ANEXO II

- PARES DE INICIADORES E CONDIÇÕES DAS REAÇÕES UTILIZADOS NA REAÇÃO NESTED-PCR PARA AMPLIFICAÇÃO DE SATR-1.

Par de iniciadores	Condições
HIPO2 Universal-1 5' GTT ATA TTA TTT TTT GTT TTT TTG 3' HIPO2 Reverso-1 5' ACA TTT CCT TAT AAT ATT ATT CC 3'	Reação 1
	95 °C – 5'
	94 °C – 3'
	48 °C – 3'
	72 °C – 2'
	94 °C – 3'
	50 °C – 3'
	72 °C – 2'
	94 °C – 1'
	52 °C – 1'
	72 °C – 1'
HIPO2 Universal-2 5' TAT AGT GGT GGT GTA TAT TTG 3' HIPO2 Reverso-2 5' CAC CTA ACC TAT AAT ATT TCT TC 3'.	72 °C – 5'
	Reação 2
	95 °C – 5'
	94 °C – 1'
	50 °C – 3'
	72 °C – 2'
	94 °C – 3'
	52 °C – 3'
	72 °C – 2'
	94 °C – 45"
	54 °C – 40"
	72 °C – 2'
	72 °C – 5'

ANEXO III

- PARES DE INICIADORES E CONDIÇÕES DAS REAÇÕES UTILIZADOS NA AMPLIFICAÇÃO DAS ILHAS DE CpG DO GENE *MMP2*

Par de iniciadores	Tamanho do fragmento	Condições	
		Reação 1	Reação 2
		95 °C – 5'	95 °C – 5'
N2F_ <i>MMP2</i>		94 °C – 45"	94 °C – 45"
5' AAG GGA TTG TTA GGA		52 °C – 45"	54 °C – 45"
TTT G 3'		72 °C – 2'	72 °C – 2'
	365 pb	94 °C – 45"	94 °C – 45"
		54 °C – 45"	56 °C – 45"
		72 °C – 2'	72 °C – 2'
		5x	5x
MMP2R1Ch		94 °C – 30"	94 °C – 30"
5' ACT CTT TAT CCR TTT		56 °C – 45"	58 °C – 45"
TAA AAA C 3'		72 °C – 2'	72 °C – 2'
(Chernov <i>et al.</i> , 2009)		72 °C – 5'	72 °C – 5'
		35x	35x

ANEXO IV

- PARES DE INICIADORES UTILIZADOS NA REAÇÃO DE qPCR APÓS A ChIP .

	Par de iniciadores	Tamanho do fragmento
	Universal	
<i>MMP2</i>	5' CCCCTGTTCAAGATGGAGTC 3'	
	Reverso	
	5' AGGTAAGGAAGCAACCTGGG 3'	156 pb

ANEXO V

- **PERFIL DE METILAÇÃO DA ILHA DE CpG DO GENE *MMP2* DA LINHAGEM MDA-MB-436 FRENTE A PRESENÇA DO SORO FETAL BOVINO (SFB).** À esquerda estão as porcentagens de metilação global correspondentes às diferentes condições de cultivo. Cultivo com SFB; cultivo sem SFB por 24h. Cada linha representa um clone e cada dinucleotídeo CpG (49) está representado por um círculo, sendo que os círculos pretos representam as citosinas metiladas, e os círculos brancos, as citosinas não metiladas.

